

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**INFLUENCIA DE ESTRÉS FRÍO EN COMBINACIÓN CON COMPUESTOS  
POLIFENÓLICOS EN LA SOBREVIVENCIA Y EXPRESIÓN DE CIERTOS  
FACTORES DE VIRULENCIA DE TRES PATOTIPOS DE *Escherichia coli*  
(EHEC, ETEC Y EPEC)**

**POR**

**Q.F.B. ANA LAURA RÍOS LÓPEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**FEBRERO, 2019**

**INFLUENCIA DE ESTRÉS FRÍO EN COMBINACIÓN CON COMPUESTOS  
POLIFENÓLICOS EN LA SOBREVIVENCIA Y EXPRESIÓN DE CIERTOS  
FACTORES DE VIRULENCIA DE TRES PATOTIPOS DE *Escherichia coli*  
(EHEC, ETEC Y EPEC).**

Comité de tesis

---

**Dr. Jorge Esteban de Jesús Dávila Aviña**  
Director

---

**Dr. José Ángel Merino Mascorro**  
Secretario

---

**Dra. Luisa Yolanda Solís Soto**  
Vocal

---

**Dra. Norma Laura Heredia Rojas**  
Vocal

---

**Dr. José Santos García Alvarado**  
Vocal

**INFLUENCIA DE ESTRÉS FRÍO EN COMBINACIÓN CON COMPUESTOS  
POLIFENÓLICOS EN LA SOBREVIVENCIA Y EXPRESIÓN DE CIERTOS  
FACTORES DE VIRULENCIA DE TRES PATOTIPOS DE *Escherichia coli*  
(EHEC, ETEC Y EPEC).**

Director de tesis

---

**Dr. Jorge Esteban de Jesús Dávila Aviña**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Jorge Esteban de Jesús Dávila Aviña y la asesoría del Dr. José Ángel Merino Mascorro, Dra. Luisa Yolanda Solís Soto, Dra. Norma Laura Heredia Rojas, Dr. José Santos García Alvarado y financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (Proyecto CB-2014-01, No. 236642).

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme despertar cada día, tener una oportunidad nueva para continuar con mis objetivos y plantear nuevos.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización del proyecto.

Gracias a la Dra. Norma Heredia y Dr. Santos García, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y por el apoyo que se me brindó durante mi estancia en el laboratorio.

Gracias infinitas al Dr. Jorge Dávila, por ser mi guía en este camino, por todo el apoyo, enseñanzas y consejos que me brindó, motivando para salir adelante, así como también agradezco a la Dra. Luisa Solís por siempre estar para cualquier duda, por el apoyo en todos los sentidos y por ser también mi guía, fueron mis ángeles en este proceso profesional y en lo personal, sin duda sin el apoyo por parte de ellos esto hubiera sido más complicado.

Gracias al Dr. Ángel Merino, por siempre tener la paciencia para resolver todas mis dudas moleculares (aunque le preguntara lo mismo varias veces), y por su buen humor contagiable.

Gracias a cada integrante del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos entre ellos Alondra, Lucero, Alberto, Janeth, Fer, Gilberto, Alexandra y Elsie, por hacer mis días más pasajeros, apoyarme y darme consejos en los momentos más indicados, los quiero mucho, me sentí como si estuviera en casa con ustedes.

A Alejandra, que fue parte del “*E.coli* team”, aportando de su tiempo y conocimiento a experimentos de este proyecto.

Gracias a mis amiguitos y hermanitos en esta aventura Alejandra, Aurora, Ana, Gerardo y Mares, porque fueron incontables veces las que me brindaron su apoyo, sin ellos este proceso de aprendizaje no hubiera sido tan divertido, tener clase y estudiar juntos era lo mejor de este mundo, los quiero mucho y serán siempre mi familia.

Gracias siempre a mis papás, por confiar en mí y en que podía lograr este objetivo, gracias por siempre darme alas para volar y seguir adelante, por apoyar cada decisión de mi vida, por darme seguridad ante mis temores y por todas sus palabras de aliento, gracias por apoyar mis sueños y gracias a la vida por tenerlos conmigo. Y también a mis hermanos y al resto de mi familia, por hacerme sentir confianza en mí.

Gracias a mi persona favorita, mi Orlando, me motivaste a continuar y siempre estuviste conmigo dándome ánimos, gracias por tu apoyo todos los días hasta en las cosas más sencillas, por tus explicaciones millones de veces cuando no entendía algún tema, siempre motivándome a ser la mejor versión de mí, gracias infinitas por apoyar mis sueños, pero sobre todo porque juntos formamos el mejor equipo del mundo, siempre alentando los sueños de cada uno.

Me siento tan bendecida por tener a personas así a mi lado.

## DEDICATORIAS

Para mis papás, Laura y Salomón, las personas más importantes de mi vida, quienes siempre me apoyaron en todo, siendo mi motivación para salir adelante, sin ustedes no lo hubiera logrado, esto es para ustedes.

A mis hermanos, Patricio, Patricia, José Luis y Saúl, quienes son mi otra mitad, gracias por el apoyo incondicional y por creer que puedo lograr las cosas que me proponga, es para ustedes. Al resto de mi familia, Vicky, Ezequiel, César, Saúl, Natalia, Eva, José Manuel, Luis Carlos, Evelyn, Juan, Nilda, Fátima, María José y Abigail, los quiero mucho.

A ti, mi Orlando, que me apoyaste incondicionalmente, me diste fuerza y motivación día a día, sin ti tampoco hubiera llegado a donde estoy, esto también es para ti.

Sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

*La ciencia llega hasta un punto, luego esta Dios.*

*Hay una fuerza extremadamente poderosa para la que hasta ahora la ciencia no ha encontrado una explicación formal. Esa fuerza es: el amor*

*-Albert Einstein.*

# ÍNDICE

	Página
Portada.....	I
Hoja de firmas.....	II
Agradecimientos.....	V
Dedicatorias.....	VII
Índice.....	VIII
Índice de tablas.....	X
Índice de figuras.....	XI
Lista de símbolos y abreviaturas.....	XIII
Resumen.....	XV
Abstract.....	XVI
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	3
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica.....	4
2.1.2 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica.....	6
2.1.3 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	7
2.2 Formación de biopelícula.....	8
2.3 Movimiento tipo swarming.....	10
2.4 Estrés por frío.....	11
2.5 Antimicrobianos naturales.....	14
3. Justificación.....	17
4. Hipótesis.....	18
5. Objetivos.....	19
5.1 Objetivo general.....	19
5.2 Objetivo específico.....	19
6. Material y métodos.....	20
6.1 Área de trabajo.....	20
6.2 Cepas microbianas y condiciones de cultivo.....	20
6.3 Compuestos naturales.....	20
	VIII



6.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de las concentraciones inhibitorias de los compuestos polifenólicos.....	22
6.5 Estrés frío.....	22
6.6 Determinación de la integridad de membrana.....	23
6.7 Determinación del movimiento tipo swarming.....	23
6.8 Determinación del índice de formación de biopelícula.....	24
6.9 Expresión de genes.....	25
6.9.1 Extracción de ARN.....	25
6.9.2 Retrotranscripción.....	26
6.9.3 PCR cuantitativa en tiempo real.....	26
6.10 Análisis estadístico.....	29
7. Resultados.....	30
7.1 Actividad antimicrobiana de los compuestos polifenólicos sobre EHEC, ETEC y EPEC.....	30
7.2 Efecto de estrés frío y compuestos polifenólicos en la integridad de membrana de patotipos de <i>Escherichia coli</i> .....	32
7.3 Efecto de estrés frío y compuestos polifenólicos en la movilidad “swarming” de patotipos de <i>Escherichia coli</i> .....	35
7.4 Efecto del estrés frío y compuestos polifenólicos sobre la formación de biopelícula de patotipos de <i>Escherichia coli</i> .....	37
7.5 Efecto del estrés frío y compuestos polifenólicos en la expresión de genes de proteínas de choque frío de patotipos de <i>Escherichia coli</i> .....	42
7.6 Efecto del estrés frío y compuestos polifenólicos en la expresión de genes de virulencia relacionados a biopelícula y swarming de patotipos de <i>Escherichia coli</i> .....	45
8. Discusión.....	49
9. Conclusiones.....	60
10. Perspectivas.....	61
11. Referencias.....	62

---

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Condiciones para preparación de master mix de retrotranscripción y PCR en tiempo real.....	27
Tabla 2. Condiciones de termociclador para retrotranscripción y PCR en tiempo real.....	27
Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para expresión de proteínas de choque frío, biopelícula y movilidad “swarming”.....	28
Tabla 4. CMB (mg/ml) para cepa de estudio (EHEC O157:H7, ETEC O78:H11 y EPEC O111:NM) con cada compuesto polifenólico.....	30
Tabla 5. Concentraciones sub-inhedorias (mg/ml) para cepa (EHEC O157:H7, ETEC O78:H11 y EPEC O111:NM) con cada compuesto polifenólico.	31
Tabla 6. Concentración sub-inhedoria (mg/ml) de cada CP seleccionada para EHEC O157:H7, ETEC O78:H11 y EPEC O111:NM.....	31
Tabla 7. Movilidad “swarming” (cm) y porcentaje de reducción de EHEC O157:H7 y ETEC O78:H11 después del tratamiento con compuestos polifenólicos (CP) e incubadas a 37°C y 10°C. Control: cepa a 37°C y 10°C sin CP.....	37
Tabla 8. Expresión del gen <i>cspA</i> y <i>cspB</i> de los tres patotipos de <i>E. coli</i> después del tratamiento con los compuestos polifenólicos (CP) e incubadas a 37°C y 10°C.....	44
Tabla 9. Expresión del gen <i>csgA</i> y <i>csgD</i> de los tres patotipos de <i>E. coli</i> después del tratamiento con los compuestos polifenólicos (CP) incubadas a 37°C y 10°C.....	46
Tabla 10. Expresión del gen <i>fliA</i> , <i>flhC</i> y <i>flhD</i> de los dos patotipos de <i>E. coli</i> después del tratamiento con los compuestos polifenólicos (CP) incubadas a 37°C y 10°C.....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Formación de biopelícula consta de cinco etapas.....	9
Figura 2.	Estados de desarrollo de la movilidad “swarming”.....	11
Figura 3.	Diagrama de flujo general de trabajo.....	21
Figura 4.	Porcentaje de mortalidad de EHEC O157:H7 después del tratamiento con compuestos polifenólicos (CP) e incubadas a 37°C y 10°C. Control: cepa sin CP a 37°C y 10°C.....	33
Figura 5.	Porcentaje de mortalidad de ETEC O78:H11 después del tratamiento con compuestos polifenólicos (CP) e incubadas a 37°C y 10°C. Control: Cepa sin CP a 37°C y 10°C.....	34
Figura 6.	Porcentaje de mortalidad de EPEC O11:NM después del tratamiento con compuestos polifenólicos (CP) e incubadas a 37°C y 10°C. Control: Cepa sin CP a 37°C y 10°C.....	35
Figura 7.	Índice de formación de biopelícula (IFB) de EHEC O157:H7 después del tratamiento con compuestos polifenólicos (CP) incubada a 37°C y 10°C. Control: Cepa sin CP a 37°C y 10°C....	39
Figura 8.	Índice de formación de biopelícula (IFB) de ETEC O78:H11 después del tratamiento con compuestos polifenólicos (CP) incubada a 37°C y 10°C. Control: Cepa sin CP a 37°C y 10°C....	40
Figura 9.	Índice de formación de biopelícula (IFB) de EPEC O111:NM después del tratamiento con compuestos polifenólicos (CP) incubada a 37°C y 10°C. Control: Cepa sin CP a 37°C y 10 °C...	41

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

---

°C	Grados Celsius
%	Porcentaje
±	Mas menos
≤	Menor o igual que
≥	Mayor o igual que
p/v	Peso/volumen
μg	Microgramos
μmol	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AIEC	<i>Escherichia coli</i> adherente invasiva
AG	Ácido gálico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
AT	Ácido tánico
A/E	Adhesión y borramiento
BFP	Pili formador de haces por sus siglas en inglés ( <i>bundle forming pili</i> )
CF	Compuestos fenólicos
CFs	Factor de colonización fibrilar por sus siglas en inglés ( <i>colonization factors</i> )
CFA	Antígeno de factor de colonización por sus siglas en inglés ( <i>colonization factor antigen</i> )
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CP	Compuestos polifenólicos
CS	Antígeno de superficie por sus siglas en inglés ( <i>coli surface</i> )
Csp	Proteínas de choque frío por sus siglas en inglés ( <i>cold shock protein</i> )
CspA	Proteína de choque frío A
CspB	Proteína de choque frío B

CspD	Proteína de choque frío D
CspE	Proteína de choque frío E
CspG	Proteína de choque frío G
CspI	Proteína de choque frío I
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
DE	Desviación estándar
DFB	Débil formador de biopelícula
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
ECD	<i>E. coli</i> diarreogénicas
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
ETA	Enfermedad transmitida por alimentos
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
Fig	Figura
FFB	Fuerte formador de biopelícula
GE	Galato de epigallocatequina
h	Hora
ICC	Infusión cerebro corazón
IFB	Índice de formación de biopelícula
IP	Ioduro de propidio
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolisacárido
LT	Enterotoxina termolábil del inglés ( <i>Labil toxin</i> )
MFB	Moderado formador de biopelícula
MG	Metil galato
mg	Miligramos
min	Minutos
MH	Mueller Hinton
ml	Mililitros

NFB	No formador de biopelícula
nm	Nanómetros
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos por sus siglas en inglés ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCF	Factor de colonización putativo por sus siglas en inglés ( <i>putative colonization factor</i> )
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Retrotranscripción PCR
Seg	Segundos
SUH	Síndrome urémico hemolítico
Stx	Shiga toxinas
STEC	<i>E. coli</i> productora de toxina shiga
ST	Enterotoxina termoestable por sus siglas en inglés ( <i>Stable toxin</i> )
Tm	Temperatura de fusión
UFC	Unidades formadoras de colonias
VT	Verotoxinas
VTEC	<i>E. coli</i> productora de verotoxinas

---

## RESUMEN

El control de especies patógenas de *Escherichia coli*, representa un desafío ya que son responsables de infecciones entéricas relacionadas con el consumo de alimentos contaminados. El uso de compuestos naturales aunado al proceso de enfriamiento como un proceso regular de conservación ha dado nuevas esperanzas para lograr un control más adecuado de estos microorganismos, en donde algunos compuestos polifenólicos (CP) han mostrado ser efectivos, sin embargo, poco se sabe sobre la eficacia de éstos en combinación con temperaturas bajas contra cepas patógenas de *E. coli*.

Es por lo anterior que la presente investigación se enfocó en determinar el efecto de cuatro compuestos polifenólicos: ácido tánico, ácido gálico, metil galato y galato de epigallocatequina, sobre tres patotipos de *E. coli*: *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enterotoxigénica y *E. coli* enteropatógena, bajo condiciones de estrés frío evaluando la integridad de membrana, movilidad “swarming”, capacidad de formación de biopelícula, así como la expresión de genes asociados a proteínas de choque frío y a dichos factores de virulencia. Se utilizaron concentraciones sub-inhibitorias de los CP (2.6 mg/ml de ácido tánico, 3.2 mg/ml de ácido gálico, 0.8 mg/ml de metil galato y 1.0 mg/ml de galato de epigallocatequina) para los tres patotipos de *E. coli*. Después del estrés frío (10°C durante 4 h) y el tratamiento con ácido tánico se obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad (50-90%) en los tres patotipos analizados, ácido gálico fue el CP que inhibió (100%) la movilidad de EHEC y ETEC. La mayor reducción de índice de formación de biopelícula (IFB) para ETEC y EPEC después de exponerse a 10°C fue con metil galato (0.35 y 0.28, respectivamente), mientras que para EHEC fue con galato de epigallocatequina (0.40). Además, se observó que la expresión de genes que codifican para proteínas de choque frío (A y B), en su mayoría se reprimió después de incubar las cepas a 10 °C y ser tratadas con los CP. De la misma manera ocurrió con la expresión de los genes *csgA* y *csgD*, después del estrés a 10°C y del tratamiento con la mayoría de los CP, sin embargo, no fue el caso en la expresión de los genes *fliA*, *flhC* y *flhD* donde la expresión se aumentó después del tratamiento con ciertos CP. Por lo tanto, los CP afectan el crecimiento y factores de virulencia después del estrés frío (10°C) por lo que pueden ser usados como conservadores de alimentos.

## ABSTRACT

Control of pathogenic species of *Escherichia coli* represents a challenge since they are responsible for enteric infections related to the consumption of contaminated food. The use of cooling combined with natural compounds as a regular conservation process has given new hope to achieve a more adequate control of these microorganisms, where some polyphenolic compounds (PC) have shown to be effective, however, little is known about the efficacy of these in combination with low temperatures against pathogenic *E. coli* strains.

Therefore, the present investigation focused on determining the effect of four polyphenolic compounds: tannic acid, gallic acid, methyl gallate and epigallocatechin gallate, on three *E. coli* pathotypes: *E. coli* enterohemorrhagic, *E. coli* enterotoxigenic and *E. coli* enteropathogenic, under conditions of cold stress, evaluating membrane integrity, motility "swarming", the capacity of biofilm formation, as well as the expression of genes associated with cold shock proteins and said virulence factors. Were used sub-inhibitory concentrations of CPs (2.6 mg/ml of tannic acid, 3.2 mg/ml of gallic acid, 0.8 mg/ml of methyl gallate and 1.0 mg/ml of epigallocatechin gallate) for the three pathotypes of *E. coli*. After the cold stress (10°C for 4 h) and the treatment with tannic acid the highest percentage of mortality was obtained (50-90%) in the three pathotypes analyzed, gallic acid was the CP that inhibited (100%) the motility of EHEC and ETEC. The greatest reduction of IFB for ETEC and EPEC after being exposed to 10°C was with methyl gallate (0.35 and 0.28, respectively), while for EHEC it was with epigallocatechin gallate (0.40). In addition, it was observed that gene expression of cold shock proteins (A and B) was mostly repressed after incubation strains at 10°C and be treated with CPs. In the same way it happened with the expression of the genes *csgA* and *csgD*, after the stress at 10°C and of the treatment with the majority of the CPs, however, it was not the case in the expression of the genes *fliA*, *flhC* and *flhD* where the expression was increased after treatment with certain PC. Therefore, PC affect growth and virulence factors after cold stress (10°C) so they can be used as food preservatives.



## 1. INTRODUCCIÓN

Se define a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) como aquellas enfermedades causadas por la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos y/o sus toxinas, además de otras sustancias químicas. Su importancia radica en ser responsables de altos niveles de morbilidad y en algunos casos de mortalidad en la población, ya sea en países en vías de desarrollo o desarrollados, conllevando a pérdidas en la salud pública, animal e industria alimentaria (Cortés-Sánchez et al. 2017).

Entre los agentes causantes de las ETAs se incluyen agentes químicos y biológicos, siendo estos últimos los más importantes pudiendo incluir virus, bacterias, hongos y parásitos. En el caso de las ETAs de origen bacteriano, los microorganismos que principalmente se encuentran involucrados incluyen a especies patógenas de *Escherichia coli*, así como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Shigella* spp. y *Listeria monocytogenes*, entre otros (Patzí-Vargas et al. 2015).

A pesar de que *E. coli* es un microorganismo considerado habitante normal del tracto gastrointestinal tanto de animales como del hombre, existen cepas con capacidad patógena causantes de diarrea en el hospedero, razón por la cual se les denomina patotipos intestinales de *E. coli* o *E. coli* diarreogénicas (ECD). Éstos se clasifican en siete grupos, y se denominan como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* adherente invasiva (AIEC). Estos patotipos son definidos y diferenciados por la presencia o ausencia de factores de virulencia específicos (Robins-Browne et al. 2016).

La mayoría de los alimentos son perecederos por naturaleza, por lo que requieren de protección para evitar su deterioro durante su preparación, almacenamiento y/o distribución. En virtud de minimizar riesgos microbiológicos en los alimentos se han desarrollado diversas estrategias para lograr su conservación adecuada, tales como enfriamiento, congelación, acidificación, fermentación e inclusive el empleo de antimicrobianos sintéticos o naturales (Negi, 2012).

La temperatura ha sido el método de conservación más utilizado en la industria alimentaria, y con frecuencia los alimentos suelen mantenerse a lo largo de su cadena de producción, almacenamiento y distribución bajo condiciones de refrigeración; sin embargo, algunos microorganismos como *E. coli* han logrado desarrollar mecanismos que permiten, aunque a bajos niveles, sobrevivir e incluso crecer en estas condiciones, modificando para ello su membrana a fin de mantener su fluidez o induciendo la expresión de proteínas de choque frío (Chung et al., 2006).

Sin embargo, es recomendable que, aunado a la temperatura, se puedan utilizar otras tecnologías que afecten a estos microorganismos, desarrollando de esta forma barreras que ayuden a garantizar la inocuidad de los alimentos. Una alternativa lo representan los productos naturales obtenidos de diferentes fuentes, incluidos animales, bacterias, algas, hongos y plantas debido a que en los últimos años el consumidor ha tomado la postura de evitar la presencia de aditivos químicos o sintéticos.

Los antimicrobianos naturales como extractos de plantas son principalmente metabolitos secundarios y son considerados una buena alternativa para asegurar la calidad de los alimentos ya que pueden proveer control del crecimiento microbiano debido a su diversidad química (Negi 2012).

El presente trabajo estuvo enfocado en determinar la capacidad de utilizar el estrés por frío en combinación con condiciones subletales de compuestos polifenólicos con potencial antimicrobiano, para determinar su efecto fenotípico y genotípico sobre algunos factores de virulencia, como formación de biopelícula, movimiento tipo swarming e integridad de la membrana en tres patotipos de *E. coli* (EHEC, ETEC y EPEC).

## 2. ANTECEDENTES

Las enfermedades causadas por la ingesta de alimentos contaminados son una amenaza constante para la salud pública y un impedimento significativo para el desarrollo socioeconómico en todo el mundo. Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son comunes y frecuentemente causan una considerable morbilidad y mortalidad, siendo la mayor causa de enfermedad y muerte en Estados Unidos, causando 9.4 millones de episodios al año, resultando en 55,961 hospitalizaciones y 1,351 muertes (Elaine et al. 2011). Dentro de los principales agentes transmitidos por los alimentos se encuentran virus, parásitos y bacterias, además de productos químicos, toxinas y alérgenos causando una amplia gama de padecimientos, tales como enfermedades ya sea diarreicas agudas, renales o infecciosas invasivas, por mencionar algunas (Havelaar et al. 2015). A pesar de que la mayoría de las ETAs son provocadas por virus, las causadas por bacterias son muy comunes, destacando como responsables a *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Vibrio* spp., *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli* (Kirk et al. 2015).

La mayoría de los agentes infecciosos causantes de ETAs se han encontrado en diversos alimentos de origen animal como cárnicos mal cocinados, lácteos, frutas, verduras, e inclusive, en productos frescos listos para el consumo sin ningún tratamiento adicional (Law et al. 2015).

Debido a que los productos frescos generalmente se consumen crudos o no son tratados adecuadamente para la eliminación de patógenos, la reducción de éstos se ha convertido en un gran desafío (Yeni et al. 2016). Diversos estudios se han centrado en contrarrestar la acción de tales patógenos en alimentos y extender su vida útil, así como en problemas relacionados con intoxicación alimentaria (Pisoschi et al. 2018).

### 2.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que puede crecer en condiciones aeróbicas y por periodos cortos anaeróbicamente preferentemente a 37 °C, aunque su rango de temperatura va de 6 a 50

°C. Es móvil por flagelos peritricos, sin embargo, se han reportado cepas no móviles (Croxen et al. 2013).

Es una bacteria que forma parte de la biota de tracto gastrointestinal tanto de humanos como de otros mamíferos, siendo su nicho la capa mucosa del colon (Yang et al. 2017). La mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas para los seres humanos, sin embargo, existen cepas que sí son capaces de producir infecciones entéricas provocando cuadros de diarrea severa, disentería, colitis hemorrágica, e incluso complicaciones como síndrome urémico hemolítico (SUH), además de cuadros extraintestinales como infecciones urinarias, bacteriemias, meningitis, peritonitis, abscesos, o infecciones de heridas (Naves y García 2010).

De acuerdo a los factores de virulencia que produce, los patrones de unión bacteriana a las células del huésped, su efecto, la producción de toxinas y su invasividad, las cepas patógenas de *E. coli* se han clasificado en siete grupos conocidos como patotipos: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (EPEC) *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* de adherencia invasiva (AIEC) (Robins-Browne et al. 2016).

Los diversos patotipos de *E. coli* tienden a ser grupos clonales que se caracterizan por antígenos O y H relacionados al lipopolisacárido (LPS) y al flagelo respectivamente, compartidos que se definen como serogrupos (solo antígeno O) o serotipos (antígenos O y H). Las cepas patógenas de *E. coli* utilizan un esquema de patogénesis de varios pasos en su huésped, que consiste en la colonización de la mucosa, evasión de las defensas, la multiplicación y como consecuencia el daño al huésped (Kaper et al. 2004).

### **2.1.1 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)**

Las cepas EHEC son un subgrupo de cepas de *E. coli* que producen toxinas de tipo Shiga (Stx) también denominadas verotoxinas (VT) por lo que al subgrupo también suele llamarse STEC o VTEC. Las propiedades de virulencia de EHEC se han asociado con su capacidad para unirse y producir las toxinas Shiga ocasionando finalmente diarrea, la cual

puede manifestarse como colitis hemorrágica y en algunos pacientes evolucionar a complicaciones como el síndrome urémico hemolítico (SUH). Se ha reportado que la mayoría de las cepas de EHEC portan una isla de patogenicidad que codifica para un sistema de secreción tipo III y proteínas efectoras homólogas a las producidas por EPEC (Kaper et al. 2004).

Aunado a esto, tienen la capacidad de fijarse y producir lesiones A/E en el epitelio intestinal (lesiones de adhesión y destrucción o “borrado”) similar a las causadas por EPEC, caracterizándose por la pérdida de microvellosidades, una adherencia íntima de las bacterias adyacentes a la membrana de la célula huésped y la generación de estructuras citoesqueléticas conteniendo filamentos de actina llamados “pedestales de actina” debajo de los sitios de unión bacteriana (Martínez Suárez et al. 2012; Campellone y Leong 2003).

La mayoría de las infecciones por EHEC son causadas por el consumo de agua contaminada o alimentos entre los que se han reportado carne cruda o poco cocida, ensalada, verduras y frutas principalmente, sin embargo, también pueden ser adquiridos a través de contacto cercano de persona a persona. La dosis infecciosa (número de células que se requiere para causar infección) suele ser muy bajo, ya que la presencia de menos de 1000 bacterias pudiera causar infección en el hospedero (Yang et al. 2017). La capacidad de adherirse, colonizar o formar biopelículas en alimentos y/o superficies es una fuente importante de transmisión de EHEC, además, que la formación de biopelícula le permite a la bacteria sobrevivir a condiciones adversas (Gomes et al. 2016).

Se han reportado diversos serotipos de EHEC tales como el O26, O111, O121 y O157, sin embargo, el O157:H7 es el que se ha reportado mayormente como responsable de brotes de ETAs en el mundo (Yang et al. 2017), siendo causal de 73,000 casos de enfermedad y 250 muertes por año tan solo en Estados Unidos (Muniesa et al. 2006).

Las infecciones con EHEC pueden variar desde diarrea acuosa leve hasta sanguinolenta. Tanto el serotipo O157 como el no-O157 pueden generar manifestaciones clínicas similares, sin embargo, la gravedad de la enfermedad puede variar, siendo O157 el serotipo implicado en la mayoría de los brotes transmitidos por alimentos (Yang et al. 2017). Diversos ensayos para diagnóstico de EHEC se han desarrollado en base a la detección de sus toxinas (Stx1 y/o Stx2), debido a que representan los principales factores

de virulencia (Gomes et al. 2016). La clasificación de estas toxinas a su vez se divide en subtipos, Stx1 teniendo tres subtipos, a, c y d, mientras que Stx2 cuenta con siete, nombrados en orden alfabético de a-g. EHEC puede poseer la Stx1 y/o Stx2 o una combinación de subtipos de las toxinas. Las toxinas son producidas en el colon, viajan por el torrente sanguíneo para llegar al riñón y causarle daño, obstruyendo los vasos sanguíneos e induciendo la producción de citocinas y quimiocinas que dan como resultado inflamación renal (Muniesa et al. 2006). Las Stx inducen muerte celular de las células endoteliales del tracto urinario y posteriormente síndrome urémico hemolítico (SUH, Sperandio y Pacheco 2012).

La Stx2, es el principal factor de virulencia. A pesar de que ambas toxinas, son similares en la secuencia de su estructura primaria, inmunológicamente son distintas, además que no se dirigen al mismo tejido u órgano blanco. Stx1 parece tener afinidad por pulmón, en tanto que la Stx2 por el riñón (Obrig 2010).

### **2.1.2 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)**

Esta bacteria es el patógeno principal causante de diarrea infantil y de la llamada “diarrea del viajero” en la mayoría de los países subdesarrollados. Las cepas de este patotipo tienen la capacidad de producir factores que les permiten la colonización del intestino delgado, donde posteriormente se produce una enterotoxina termolábil (LT por sus siglas en inglés) y una enterotoxina termoestable (ST por sus siglas en inglés) las cuales al ser liberadas por la bacteria se unen a la superficie de la célula blanco dando lugar a una secreción intestinal aumentada y como consecuencia diarrea, aunado a ello, es capaz de producir factores de colonización fibrilar (CFs por sus siglas en inglés) tales como, antígeno de factor de colonización (CFA por sus siglas en inglés), antígeno de superficie coli (CS por sus siglas en inglés) y/o factor de colonización putativo (PCF por sus siglas en inglés) (Yang et al. 2017).

Las cepas de ETEC se ha reportado que pueden expresar la LT o ST o ambas. Las toxinas LT son una clase de enterotoxinas que están estrechamente relacionadas en su estructura y función a la enterotoxina producida por *Vibrio cholerae* (Kaper et al. 2004).

La diarrea causada por ETEC surge de un desbalance mediado por dichas toxinas producidas, además, se altera la homeostasis celular a través de la liberación de factores de virulencia que secreta donde sus mecanismos de adherencia son fundamentales para su liberación (Sanchez-Villamil y Navarro-Garcia 2015).

La dosis infecciosa es relativamente alta comparada a otros patotipos de *E. coli*, encontrándose entre  $10^6$  y  $10^8$  bacterias. Las infecciones por ETEC se transmiten por vía fecal-oral y los síntomas clínicos típicos incluyen diarrea que inicia repentinamente con heces acuosas, dolor abdominal, náuseas, vómito y fiebre que conducen a una deshidratación debido a la pérdida de líquidos y electrolitos en las heces. Algunos de los alimentos que presentan alto riesgo de contaminación son aquellos que se dejan a temperatura ambiente, ciertas frutas y comida de vendedores ambulantes, sobre todo en agua contaminada que es utilizada para preparar los alimentos. La rehidratación oral y tratamiento con antibióticos suelen ser eficaces para controlar la infección (Croxen et al. 2013).

### **2.1.3 *E. coli* enteropatógena (EPEC)**

Este grupo bacteriano se encuentra frecuente en entornos comunitarios como escuelas y hospitales, y es una de las principales causas de diarrea persistente, considerándose un patógeno diarreico importante en niños menores de 2 años (Pearson et al. 2016). Dentro de los síntomas más comunes se incluye diarrea acuosa, dolor abdominal, náuseas, vómito y fiebre (Yang et al. 2017). Se transmite de un huésped a otro a través de la vía fecal-oral mediante superficies contaminadas y portadores humanos. Los alimentos que presentan mayor probabilidad de contaminación incluyen agua contaminada y jugos. Esta bacteria es capaz de adherirse al epitelio intestinal y provocar el “borrado” de la estructura característica de las microvellosidades, es decir, la pérdida de continuidad del epitelio intestinal, (lesión A/E), y es acompañada por la formación de pedestales de actina que se extienden desde la superficie del epitelio hasta el lumen intestinal (Croxen et al. 2013). El pili formador de haces (BFP, por sus siglas en inglés) que le permite una adhesión de tipo localizada, es bien reconocido como un factor de virulencia importante en estas cepas (Naves y García 2010). La acumulación de actina en la lesión A/E, la cual es visible

mediante microscopía electrónica, es una prueba utilizada para el diagnóstico y diferenciación con otros patotipos intestinales de *E. coli* (Pearson et al. 2016)

Aunque el mecanismo exacto para generar la diarrea no está claramente entendido, se cree que están involucrados varios procesos, sin embargo, la eliminación de las microvellosidades podría conducir a una disminución en las superficies de absorción contribuyendo así a la diarrea (Croxen et al. 2013). Se estima que la dosis infecciosa de EPEC es de  $10^8$  bacterias (Yang et al. 2017).

Además de diarrea aguda se han reportado casos persistentes donde la diarrea tiene duración de más de dos semanas. En comparación con la infección ocasionada por otros patógenos de alimentos, EPEC tiene mayor probabilidad de desarrollar diarrea persistente y hospitalización (Croxen et al. 2013). En la mayoría de los casos, el tratamiento radica en hidratación oral del paciente, mientras que las infecciones persistentes suelen requerir la administración de antimicrobianos (Yang et al. 2017).

## **2.2 Formación de biopelículas**

Se ha demostrado que bacterias como *E. coli* son capaces de crecer adheridas a casi todas las superficies formando comunidades arquitectónicamente complejas llamadas biopelículas, donde las células crecen en agregados multicelulares que están encerrados en una matriz extracelular producida por las propias bacterias (López et al. 2010) y compuesta de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en ingles) que en conjunto con las proteínas asociadas a la superficie celular y ácidos nucleicos, constituyen la “matriz de la biopelícula” (Landini 2009).

Dicha matriz extracelular, es la responsable de la adhesión a las superficies y de la cohesión de la biopelícula, además de inmovilizar a las células y mantenerlas en estrecha proximidad permitiendo con ello interacciones célula-célula. Esta matriz protege a las bacterias contra la desecación, oxidación, radiación ultravioleta, ciertos antibióticos y sistema inmunitario del huésped. En la mayoría de las biopelículas los microorganismos representan menos del 10% de peso seco, mientras que la matriz representa el 90% restante (Flemming y Wingender 2010).



La formación de la biopelícula es un proceso dinámico que consta de cinco etapas: 1) fijación inicial reversible de células planctónicas (móviles de vida libre) que se acercan a la superficie sólida por medio de su motilidad, 2) transición de la unión reversible a irreversible mediante la producción de polímeros extracelulares y/o adhesinas de pilis o fimbrias bacterianos que interactúan con la superficie, 3) desarrollo temprano de la arquitectura de la biopelícula, 4) desarrollo de microcolonias de biopelícula madura, en cuya etapa también se producen sustancias poliméricas extracelulares y 5) dispersión de células de la biopelícula al entorno y regreso al estado planctónico (Fig. 1). La formación de biopelícula puede verse afectada por diversos factores incluyendo el tipo de cepa bacteriana, propiedades superficiales del material y parámetros ambientales como pH y temperatura (Srey et al. 2013).

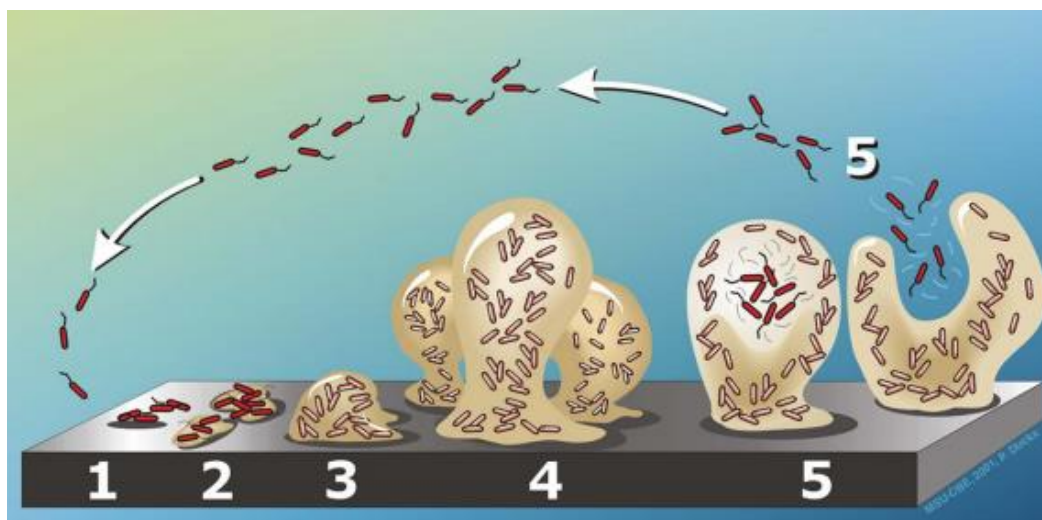


Figura 1. Formación de biopelícula que consta de cinco etapas. Etapa 1: Fijación reversible, etapa 2: unión irreversible, etapa 3: desarrollo temprano de biopelícula, etapa 4: biopelícula madura, etapa 5: dispersión (Van Houdt and Michiels 2005)

Para la industria alimentaria, la formación de biopelícula en superficies asociadas a alimentos, así como en sistemas de distribución de agua potable, es de suma importancia ya que constituye un mayor riesgo de contaminación propia a los alimentos (Van Houdt y Michiels 2010).

### **2.3 Movimiento tipo swarming**

Las bacterias no son organismos solitarios, en sus hábitats naturales forman grandes y densas comunidades donde algunas bacterias móviles utilizan un tipo de movimiento característico denominado “swarming” que le permite acceder a nutrientes, incrementar el tamaño de la comunidad y colonizar nuevos ambientes (Swiecicki et al. 2013).

El movimiento tipo “swarming” se define como un movimiento bacteriano multicelular a través de una superficie impulsado por la rotación de flagelos (Kearns 2010), y se manifiesta por la presencia de una película fina de crecimiento expansivo a partir de las colonias. Es un mecanismo dependiente del flagelo permitiéndole la rápida colonización de entornos ricos en nutrientes (García-Heredia et al. 2016), e involucra la secreción de agentes humectantes (como surfactantes y exopolisácaridos) que incrementan la humedad de la superficie facilitando el movimiento (Escobar Rodríguez 2010).

Esta movilidad requiere de un medio sólido rico en nutrientes y es promovido por altas tasas de crecimiento explicando con ello el alto requerimiento de energía. La mayoría de las bacterias pueden moverse sobre casi cualquier superficie de agar, sin embargo, la mayoría requieren de agar blando en un rango estrecho de concentraciones de agar (aprox. 0.3%) y que obligan a las bacterias a moverse sobre la superficie (Kearns 2010).

El movimiento tipo swarming consiste inicialmente en la diferenciación de las células normales a una forma especializada conocida como células *swimmers* o nadadoras las cuales se caracterizan por un aumento en el número de flagelos y la elongación de la célula, realizando un movimiento tipo ráfaga multicelular a través de la superficie. Consta de tres estados: 1) reconocimiento de las señales ambientales, dando como resultado la formación de células nadadoras hiperflageladas y elongadas (diferenciación), 2) movimiento coordinado de células nadadoras (migración) y 3) consolidación de células vegetativas, iniciando de un nuevo grupo de swarming (Fig. 2) (Escobar Rodríguez 2010).

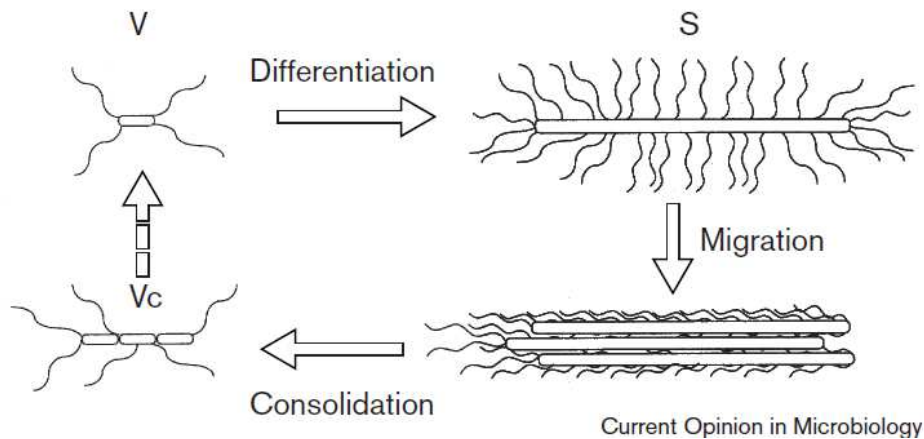


Figura 2. Estados de desarrollo de la movilidad "swarming" V= células vegetativas, S= células "swarm", Vc= regreso a forma vegetativa (Kearns 2010).

## 2.4 Estrés por frío

El estrés se define como cualquier condición adversa que puede causar en las bacterias un impacto negativo, sin embargo, en éstas pueden inducir respuestas adaptativas y protectoras, además, alterar los patrones de expresión génica y la fisiología celular (Poole 2012), con la finalidad de sobrevivir a condiciones extremas, rápidamente variables y dañinas para las bacterias (Giuliodori et al. 2007).

Para ciertos microorganismos, la exposición a temperaturas bajas puede ocasionar lesiones letales donde la membrana celular es el principal blanco, además de alterar el plegamiento de las proteínas y estabilizar la estructura secundaria del ARN. La sensibilidad de las células al estrés frío depende de varios factores como lo son la temperatura, el medio de cultivo, y la concentración microbiana (Mihoub et al. 2003). Sin embargo, se ha observado que las células son capaces de desarrollar una respuesta de adaptación a la temperatura fría activando mecanismos que ayudan a estabilizar la fluidez de la membrana, así como cambios en la maquinaria de traducción de proteínas (Duval et al. 2010).

La temperatura ya sea alta o baja puede influir de manera directa e indirecta en la respuesta de los microorganismos, en la primera se tiene efecto en la velocidad de crecimiento, actividad enzimática, composición celular, requerimientos nutricionales, y en la segunda

afecta la solubilidad de solutos, transporte y difusión por iones y efectos osmóticos en la membrana (Beales 2004).

La respuesta al estrés frío se provoca cuando las células que crecen exponencialmente son transferidas de su temperatura óptima a una de crecimiento significativamente más baja (usualmente 15 °C en muchas bacterias), en donde la síntesis de la mayoría de las proteínas celulares se ve disminuida, sin embargo, hay proteínas inducidas bajo esas condiciones denominadas proteínas de choque frío (Csp, cold shock protein por sus siglas en inglés) (Phadtare 2012).

La respuesta al choque frío data de 1987, cuando se sometió a *E. coli* a condiciones de frío (15 °C) donde se obtuvo un patrón específico de expresión génica en respuesta a cambios bruscos a temperaturas más bajas que su temperatura óptima. Ahora se sabe que este patrón incluye la inducción de Csp, síntesis continua de proteínas que están involucradas en el proceso de transcripción y traducción (Barria et al. 2013).

En este ámbito, las Csp constituyen una familia de proteínas pequeñas implicadas en diferentes procesos celulares como la degradación de ARN anormal, replicación de ADN, transcripción, traducción y maduración del ribosoma. Se ha determinado que por lo general estas proteínas están compuestas de 67 a 75 aminoácidos. A la vez se ha reportado que estas proteínas pueden funcionar como anti-terminadores transcripcionales en *E. coli* ya que son proteínas de unión a ácidos nucleicos que favorecen el estado monocatenario del ADN o ARN (Horn et al. 2007). El número de proteínas Csp presentes en cada especie varía de una a doce, existiendo en la mayoría de las células de tres a nueve genes *csp* lo cuales codifican a dichas proteínas (Czapski y Trun 2014).

La primera proteína descrita que era inducida por un choque frío en *E. coli* fue CspA, la cual alcanzó una concentración de 100 µM dentro de 1 a 1.5 h en la que la temperatura disminuye de 37 °C a 15-10 °C, sin embargo, ocho proteínas más, nombradas en orden alfabético de CspB a CspI homólogos a CspA también se han identificado en esta bacteria. CspB, CspG y CspI son inducidas por disminución de la temperatura ( $\leq 15$  °C), mientras que CspC y CspE se expresan tanto en aumento como en disminución de la temperatura (37 °C a 15 °C), mientras que CspD es inducida durante la fase de depleción de nutrientes.

Aunque las Csp ya han sido estudiadas y caracterizadas, su función exacta no ha sido dilucidada aún (Ermolenko y Makhatadze 2002).

Por otro lado, desde el año 1990 Goldstein et al., reportaron que al someter a células de *E. coli* de 37°C a 10-15°C se indujo la producción de una proteína citoplásmica con un peso molecular de 7.4 kDa (llamada CS7.4, por cold shock), indetectable a 37°C y presuntamente identificada como proteína de choque frío y la cual representó un 13% del total de proteínas totales en la célula (Goldstein et al. 1990).

Así mismo, se ha reportado que la expresión de las proteínas de choque frío alcanza su nivel máximo durante la fase de adaptación al estrés, llamada aclimatación (Ermolenko y Makhatadze 2002). Después de esta fase, las células se adaptan a esta baja temperatura y restablecen su crecimiento a velocidad más lenta, además, ocurren cambios fisiológicos que incluyen disminución en la saturación de ácidos grasos y la inducción de 16 proteínas de choque frío (Barria et al. 2013). Se conoce que entre las proteínas inducidas se incluye proteínas modificadoras del ARN, 3' a 5' exoribonucleasas RNasa R, ARN helicasas DeaD, PNasa, factores de transcripción, moduladores del cromosoma y la familia de las Csp (Zhang et al. 2018). Se ha reportado que aún en condiciones de temperatura más baja las células pueden sobrevivir, observando el efecto de adaptación al frío (3 h a 4 °C) seguida de -20 °C por 24 h (Mihoub et al. 2003).

Las Csp son críticas para el crecimiento a temperaturas bajas, tanto que mutaciones en los genes *cspA*, *cspB* y *cspG* resultan en incapacidad de la bacteria para dividirse (Zhang et al. 2018). Además, se ha demostrado que las Csps son cruciales para la patogenicidad en bacterias como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, además de *E. coli*, sugiriendo que supresiones o mutaciones del gen *csp* en dichos organismos pueden causar fenotipos de virulencia atenuados (Eshwar et al. 2017). CspA de *Xanthomonas oryzae*, además de participar en la respuesta de adaptación a temperaturas bajas, también puede facilitar la virulencia contra el arroz, ya que la proteína puede unirse a genes relacionados con su patogenicidad que codifiquen para una proteína de quimiotaxis, aumentando con ello la virulencia que esta bacteria (Wu et al. 2018).

## **2.5 Antimicrobianos naturales**

La mayoría de los alimentos son perecederos por naturaleza, por lo que requieren de protección para evitar su deterioro durante su preparación, almacenamiento y/o distribución. Actualmente la demanda de consumir productos mínimamente procesados, de fácil preparación y listos para el consumo, plantea retos importantes para la inocuidad y calidad de los alimentos. Microorganismos como bacterias y hongos pueden contaminar los alimentos y causar considerables reacciones que deterioran el sabor, olor, color y las propiedades de textura propias del alimento, e incluso provocando ETAs.

Para evitar el crecimiento de microorganismos patógenos y/o el deterioro de alimentos se utilizan técnicas de conservación, tales como tratamiento térmico, acidificación y/o secado. En los últimos años debido a la gran preocupación del consumidor por evitar la presencia de aditivos químicos o sintéticos, han cobrado importancia los productos naturales, obtenidos de diferentes fuentes, incluidos animales, bacterias, algas, hongos y plantas (Gyawali y Ibrahim 2014).

Los antimicrobianos naturales como extractos de plantas son principalmente metabolitos secundarios y son considerados una buena alternativa para asegurar la calidad de los alimentos ya que pueden proveer control del crecimiento microbiano debido a su diversidad química (Negi 2012). Dentro de los principales grupos de componentes que son responsables de la actividad se encuentran los ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos y compuestos fenólicos. Estos últimos están compuestos de anillos aromáticos y uno o más grupos hidroxilo, y se encuentran en una gran variedad de productos como frutas, vegetales, té verde y tallos de flores. Dentro del grupo de compuestos fenólicos se encuentra la clase de polifenoles que incluye a los taninos, ligninas y flavonoides. Los polifenoles han adquirido gran interés por su actividad antimicrobiana la cual es dependiente de su estructura química y está relacionada con la inactivación de enzimas celulares debido a que provocan cambios en la permeabilidad de la membrana y la consiguiente pérdida del contenido celular (Mandal et al. 2017).

La posición de la sustitución del radical OH en el anillo aromático y la longitud de la cadena lateral saturada se cree son factores que influyen en la actividad antimicrobiana, y

se ha encontrado que una alta actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos también depende del tamaño del grupo alquilo o alqueno añadido (Cueva et al. 2010).

Algunos ácidos fenólicos como el ácido gálico y ácido caféico han mostrado actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluso contra aquellas que muestran resistencia a antibióticos convencionales. Se ha estudiado el efecto antimicrobiano del ácido gálico en cultivos de *E. coli*, encontrando que el compuesto inhibe el crecimiento bacteriano a concentraciones superiores a 1 mg/ml (Díaz-Gómez et al. 2014).

El galato de epigallocatequina, otro compuesto fenólico, se ha reportado que causa daños en la membrana de *E. coli* y la pérdida de componentes intracelulares tales como proteínas y enzimas, algunos iones como sodio y potasio, y la reducción de azúcares (He et al. 2014). El compuesto ácido tánico también ha mostrado actividad inhibitoria del crecimiento de *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Sauceda 2011), a concentraciones mayores a 1 mg/ml (Widsten et al. 2014).

Una limitante de la utilización masiva de estos compuestos naturales radica en que con frecuencia la concentración necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano es tan alta en los alimentos provocando cambios significativos de las propiedades sensoriales del alimento; sin embargo, la eficacia de estos compuestos puede ser mejorada al utilizarlos en combinación con condiciones estresantes, tal como una baja temperatura (Negi 2012).

La cuantificación de la actividad *in vitro* de antimicrobianos se evalúa regularmente mediante técnicas microbiológicas tradicionales, dentro de las cuales se encuentran los métodos de difusión en disco y dilución en caldo o agar, siendo los últimos los más apropiados para la determinación de los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB), ya que ofrecen la posibilidad de estimar la concentración del agente antimicrobiano analizado en el agar (dilución de agar) o medio de caldo (macrodilución o microdilución) (Balouiri et al. 2015).

La CMI es la más baja concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del microorganismo en pozos de microdilución o tubos, aunque puede o no afectar su viabilidad, mientras que la CMB es definida como la más baja concentración

de antimicrobiano que elimina el 99.9% de los microorganismos después de un tiempo determinado de incubación (Andrews 2001). A su vez, la concentración sub-inhibitoria es definida como la concentración de agente antimicrobiano que no es activo en el crecimiento bacteriano, pero es activo en la alteración de la bioquímica y la forma bacteriana y por lo tanto reduce la virulencia bacteriana (Braga et al. 2000).

Compuestos como galato de epigallocatequina han sido probados para determinar su efecto sobre factores de virulencia de *E. coli* O157:H7 encontrando que a 25 µg/ml no se afectó el crecimiento de dicha bacteria, sin embargo, sí se disminuyó cerca de 80% la formación de biopelícula y 50% la movilidad tipo swarming, sugiriendo con ello que este compuesto a concentraciones sub-inhedorias tienen efecto antipatogénico contra este microorganismo (Lee et al. 2009).

Borges et al. (2013) encontraron que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del ácido ferúlico y ácido gálico para bacterias como *E. coli* fue de 1.5 y 10 mg/ml respectivamente. Ambos compuestos causaron en la bacteria cambios en las propiedades de membrana (permeabilidad, cambios fisicoquímicos), formando poros (Borges et al. 2013b). Se ha reportado además que el ácido gálico puede inhibir la formación de biopelícula en *E. coli* a 25°C (Shao et al. 2015), e interferir con la movilidad tipo swarming en bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* (Borges et al. 2012).

Adicionalmente, se ha determinado que compuestos polifenólicos como el ácido tánico y galato de epigallocatequina pueden bloquear la movilidad tipo swarming de bacterias Gram negativas (O'May et al. 2012), y que a 23°C inducir la expresión de diversos genes en respuesta a condiciones de estrés como un choque por frío en *E. coli* K-12 (White-Ziegler et al. 2008).



### 3. JUSTIFICACIÓN

*E. coli* es una bacteria que habita normalmente en el tracto gastrointestinal de animales y humanos, sin embargo, se han reportado cepas patogénicas que provocan altos índices de ETAs. Estas cepas se agrupan en patotipos, de los cuales, el enterohemorrágico (EHEC), enterotoxigénico (ETEC) y enteropatógeno (EPEC) son muy frecuentes, que inician por un cuadro diarreico, que, dependiendo de la susceptibilidad del hospedero y los factores de virulencia que porte el patógeno, pudieran llegar a complicaciones importantes e incluso la muerte.

Los microorganismos han desarrollado mecanismos para sobrevivir en condiciones estresantes para ellas. El estrés por frío es una condición a la que con frecuencia se someten los microorganismos ya sea de manera natural, o bien como una estrategia de control. En *E. coli* se ha reportado que la exposición a una condición de frío provoca en la bacteria la expresión de genes que codifican para proteínas de choque frío, favoreciendo con ello la sobrevivencia del microorganismo e inclusive se ha demostrado que se ve incrementada la producción de biopelícula.

En la actualidad los esfuerzos se han orientado a explorar alternativas para lograr el control microbiano de manera efectiva mediante el uso de antimicrobianos naturales debido a la preferencia de los consumidores por adquirir productos alimenticios naturales. Dentro de los compuestos naturales que han mostrado poseer potencial antimicrobiano se encuentran los compuestos polifenólicos, que aparte de tener la capacidad de eliminar microorganismos, a concentraciones sub-inhibitorias, pueden disminuir la expresión de genes relacionados con la virulencia de algunas bacterias, tales como los de formación de biopelícula y movimiento tipo swarming. A pesar de estos beneficios, el efecto que condiciones de estrés frío aunado a los compuestos polifenólicos pueden ejercer sobre patotipos de *E. coli* no está completamente elucidado.

Por lo anterior, se propuso determinar el efecto de compuestos polifenólicos sobre el crecimiento, formación de biopelícula y movimiento tipo swarming de tres patotipos de *E. coli* (EHEC, ETEC y EPEC) después de ser sometidas a un estrés por frío (10 °C).

#### **4. HIPÓTESIS**

Algunos compuestos polifenólicos afectan la sobrevivencia y expresión de factores de virulencia de tres patotipos de *E. coli* (EHEC, ETEC y EPEC) bajo condiciones de estrés por frío (10°C).

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 General

Determinar la alteración en la sobrevivencia y la expresión de factores de virulencia en tres patotipos de *E. coli* (EHEC, ETEC y EPEC) expuestas a estrés frío (10°C) y compuestos polifenólicos (ácido tánico, ácido gálico, metil galato y galato de epigallocatequina).

### 5.2 Específicos

1. Determinar el efecto de estrés frío (10°C) y compuestos polifenólicos (ácido tánico, ácido gálico, metil galato y galato de epigallocatequina) sobre el crecimiento bacteriano de tres patotipos de *E. coli* (EHEC, ETEC y EPEC).
2. Evaluar el efecto de estrés frío (10°C) y compuestos polifenólicos (ácido tánico, ácido gálico, metil galato y galato de epigallocatequina) sobre la integridad de membrana, movilidad tipo “swarming” y formación de biopelícula en tres patotipos de *E. coli* (EHEC, ETEC y EPEC).
3. Determinar la expresión génica de las proteínas de choque frío CspA y CspB de tres patotipos de *E. coli* (EHEC, ETEC y EPEC) sometidas a estrés frío (10°C) y compuestos polifenólicos.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Área de trabajo**

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos, del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### **6.2 Cepas microbianas y condiciones de cultivo**

Para el presente estudio se trabajó con tres patotipos de *Escherichia coli*: EHEC O157:H7 (ATCC 43895) donada por la Dr. Lynne McLandsborough del Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Massachusetts, Amherst, MA, USA, ETEC O78:H11 (ATCC 35401) y EPEC O111:NM (ATCC 43887), estas últimas adquiridas comercialmente. Todas las cepas se mantuvieron como cultivos de reserva a -80°C con glicerol (20% v/v). A partir de estos se tomó una alícuota de 50 µl y se inoculó en 5 ml (1% v/v) de caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC, Bioxon, Becton Dickson de Mexico, S.A. de C.V.), y posteriormente fueron incubadas a 37°C por 24 h. Para la realización del cepario de trabajo, a partir de este cultivo se tomó una asada que fue inoculada en agar ICC en agar inclinado el cual se incubó por 24 h a 37°C para finalmente conservarlo a 4°C por un máximo de tres meses, al cabo del cual se realizaron resiembras.

Para la activación de los cultivos se tomó una asada del agar ICC y se inoculó en 5 ml de caldo Mueller Hinton (MH, Bioxon, Becton-Dickinson, Mex.) y se incubaron por 24h a 37°C.

### **6.3 Compuestos naturales comerciales**

Los compuestos polifenólicos que se utilizaron fueron: ácido tánico (403040), ácido gálico (G7384), metil galato (274194) y galato de epigallocatequina (E4268) de alta pureza los cuales fueron adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich de México). Los compuestos de

trabajo fueron preparados utilizando como solvente etanol al 35% y se mantuvieron en agitación constante hasta solubilizar el compuesto y protegidos de la luz, los cuales fueron utilizados para los posteriores ensayos.

En la figura 3 se muestra el diagrama de flujo general que se llevó a cabo para la realización del trabajo.

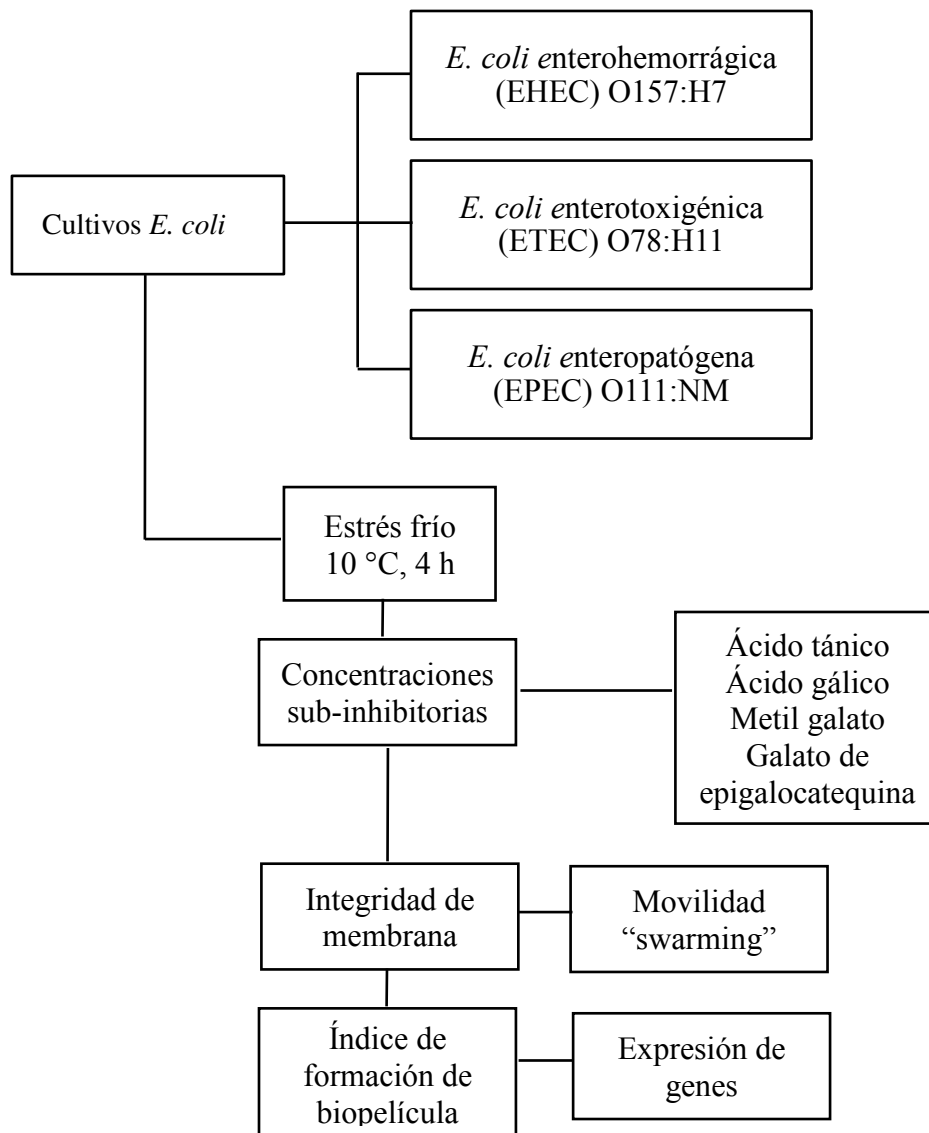


Figura 3. Diagrama de flujo general de trabajo

#### **6.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de las concentraciones inhibitorias de los compuestos polifenólicos**

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó mediante curvas de crecimiento basadas en medición de absorbancia a 600 nm, utilizando un lector de microplacas automatizado (Epoch, Biotek® Winooski, Vermont, U.S.A). Para lo cual se inocularon microplacas estériles de 96 pocillos (BD Falcon) con 122.5 µl de caldo MH 2X y 125 µl de los compuestos polifenólicos ajustados a diferentes concentraciones. Posteriormente se inocularon con 2.5 µl de cultivos activos de cada patógeno (ajustados a  $1 \times 10^8$  UFC/ml) para después incubar por 24 h a 37°C, obteniendo lecturas cada 20 minutos. El crecimiento microbiano se determinó mediante siembra por goteo de una alícuota de 10 µl de cada pocillo en agar MH, y posteriormente incubado a 37°C por 24 h. Se definió como concentración mínima bactericida (CMB) a la más baja concentración de compuesto polifenólico que después del periodo de incubación no permitió el crecimiento de la bacteria (Orue et al. 2013). Mientras que la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue definida como la concentración más baja de compuesto polifenólico que inhibe el crecimiento del microorganismo en pozos de microdilución según lo detectado con base en la turbidez (Balouiri et al. 2016). Como controles se utilizaron los medios con los compuestos polifenólicos a probar, medio con las cepas de estudio no expuestas a 10°C y sin compuesto polifenólico, medio con las cepas de estudio expuestas a 10°C y sin compuesto polifenólico y medio sin cepas de estudio y sin compuesto polifenólico.

#### **6.5 Estrés por frío**

Para este ensayo, cultivos activados de *E. coli* se crecieron hasta la mitad de la fase logarítmica (aproximadamente 4 h a 37 °C) después de esto fueron expuestos a temperatura de 10 °C (Isotemp® Fisher Scientific) durante 4 h para generar una respuesta al estrés por frío (Goldstein et al. 1990), posteriormente se agregaron los compuestos polifenólicos a las concentraciones seleccionadas. En estos tratamientos se analizaron los parámetros fisiológicos asociados a la virulencia: integridad de membrana, movilidad tipo swarming, formación de biopelícula y la expresión de proteínas de estrés por frío, tal como se describe a continuación.

## **6.6 Determinación de integridad de la membrana**

Para determinar cambios en la permeabilidad de la membrana por exposición al frío y/o compuestos polifenólicos se siguió la metodología propuesta por Witkowska et al. (2013), la cual se describe a continuación. Partiendo de un cultivo de 2 ml de células sometidas por 24 h con las concentraciones sub-inhedoras de los compuestos polifenólicos, se realizaron dos lavados con 2 ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.0 estéril y se resuspendieron con 2 ml del mismo amortiguador. Las células fueron teñidas con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD<sup>TM</sup>BacLight<sup>TM</sup> (Invitrogen<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific, Marietta, OH, USA) que consiste de dos colorantes para ácidos nucleicos: SYTO 9 verde fluorescente y ioduro de propidio (IP) rojo fluorescente, donde el primer colorante tiñe todas las células bacterianas en tanto que el segundo sólo penetra las células que han sufrido daño en su membrana. Para ello, alícuotas de 2 ml del cultivo celular se mezclaron con 6 µl de la solución del kit (concentración final de 6 µmol/l de Syto 9 y 30 µmol/l de IP), y se incubaron por 3 a 5 min en oscuridad a temperatura ambiente.

Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo Attune<sup>®</sup> Acoustic Focusing Cytometer Maintenance Log equipado con láser cyan de 20 mW 638 y 488 nm láser (rojo y azul). Los datos que se obtuvieron fueron de dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) y se utilizó una emisión de 530/30 (FL1) para SYBR Green I, y controles de 5 log UFC/ml. Como controles se utilizó a la cepa sin adición de compuesto polifenólico, y cepa sin exposición a choque frío y sin compuesto polifenólico.

## **6.7 Movimiento tipo swarming**

Para este ensayo no se analizó la cepa EPEC O111:NM debido a que es una cepa no móvil. Para las cepas restantes, EHEC y ETEC se siguió la metodología propuesta por García-Heredia et al. (2013) con modificaciones, donde se utilizó agar suave (caldo Luria Bertani de Bioxon adicionado con 0.3% de agar bacteriológico). Cultivos activos de *E. coli* se incubaron a 37°C hasta alcanzar la mitad de su fase logarítmica (aproximadamente 4 h). Posteriormente se tomaron 20 µl de estos cultivos y se mezclaron con un volumen igual

de compuestos polifenólicos (1:1) a las concentraciones sub-inhedorias, de los cuales 5 µl fueron inoculados en el centro de las placas de agar suave y se incubaron durante 18-24 h a 37°C (Lee et al. 2009). Pasado el tiempo de incubación, se determinó la movilidad y el porcentaje de reducción de movilidad “swarming” mediante la medición del diámetro de la colonia. Como controles se utilizaron la cepa sin adición de compuesto polifenólico, y cepa sin exposición a choque frío y sin compuesto polifenólico.

### **6.8 Determinación del índice de Formación de Biopelícula (IFB)**

Para este ensayo se siguió la metodología propuesta por García-Heredia et al. (2016). Cultivos activados de *E. coli* se incubaron a 37°C hasta alcanzar la mitad de su fase logarítmica (aproximadamente 4 h). Después de esto, las células se expusieron a estrés por frío (10 °C) durante 4 h, posteriormente 2.5 µl del cultivo se transfirió al mismo medio a doble concentración pero conteniendo 125 µl de los compuestos polifenólicos a las concentraciones sub-inhedorias en pozos de microplaca estéril (96 pocillos) y se incubaron a 37°C por 24 h. Pasado el tiempo de incubación se determinó la absorbancia a 630 nm utilizando el lector de microplacas Epoch, posteriormente se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con 250 µl de agua destilada estéril, quedando la biopelícula adherida a la superficie la cual fue teñida durante 15 min con 200 µl de cristal violeta (0.1% p/v), posteriormente se lavó tres veces con 200 µl de agua destilada estéril y finalmente para que el colorante de la biopelícula fuera disuelto se añadieron 200 µl de etanol al 95% (v/v) y después de 5 min a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 570 nm en el lector de microplacas.

El Índice de Formación de Biopelícula (IFB) se determinó con la fórmula:  $IFB = (AB - CW) / G$ , en donde AB fue la densidad óptica (570 nm) de las bacterias teñidas, CW fue la densidad óptica (570 nm) del medio de cultivo (libre de microorganismos) teñido y G la densidad óptica (630 nm) del crecimiento celular en cultivo suspendido no teñido. De acuerdo al valor de IFB, la biopelícula se consideró: fuerte si IFB es  $\geq 1.10$ , moderado si esta entre 0.70-1.09, débil entre 0.35-0.69 y no formación de biopelícula si el IFB es  $\leq 0.35$ . Como controles se utilizaron los medios con los compuestos fenólicos a probar, medio



con las cepas de estudio expuesta a 10°C y sin compuesto polifenólico y medio con las cepas de estudio no expuestas a 10°C y sin compuesto polifenólico.

## **6.9 Expresión de genes**

Para evaluar la expresión de genes asociados a proteínas de choque frío (Csp), a la movilidad “swarming” (*flhA*, *flhC* y *flhD*) y a la formación de biopelícula (*csgA* y *csgD*) se utilizaron células de *E. coli* que fueron sometidas a estrés frío de 10°C y compuestos polifenólicos, como se menciona a continuación:

### **6.9.1 Extracción de ARN**

Para el primer paso de qPCR se llevó a cabo la extracción total de ARN siguiendo la metodología descrita por Czapski y Trun (2014), utilizando TRIzol® y adición del alcohol isopropílico; después del estrés frío al que se sometieron las cepas por 4 h seguido del tratamiento con los compuestos polifenólicos, se tomaron 250 µl de cada cultivo y se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 minutos para obtener el precipitado celular, después de esto se adicionó el mismo volumen de TRIzol®, se incubó 5 min a 4°C y se agregaron 50 µl de cloroformo (Jalmek, México). Posterior a ello, las muestras se centrifugaron (accuSpin Micro 17R Fisher Scientific) a 12,000 rpm por 10 min a 4°C, la fase acuosa (ARN) se recuperó y se le añadieron 125 µl de alcohol isopropílico (Sigma Aldrich, México) dejándose precipitar toda la noche a -20°C, posterior a esto se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Al precipitado se le añadieron 250 µl de etanol al 70% para purificar el ARN y nuevamente se centrifugó a las condiciones anteriormente mencionadas, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar por 5-10 min, al término del cual se resuspendió en 30 µl de agua miliQ libre de ARNasas. La concentración de ARN y la pureza se determinó por absorbancia usando un espectrofotómetro UV-Vis (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, México), midiendo la relación 260/280 nm, sugiriendo utilizar las muestras con una relación cercana a 2.0. Las muestras de ARN fueron almacenadas a -80°C hasta su uso para posteriores ensayos.

Para realizar la extracción del ARN en las bacterias inmersas en biopelículas, una vez formada ésta, se retiraron las células en suspensión por extracción con micropipeta

quedando únicamente las células adheridas al fondo y de las cuales se tomaron con ayuda de 250 µl de PBS estéril 1X pH 7 y se colocaron en tubos de 1.5 ml (Eppendorf), posteriormente las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 min, eliminando el sobrenadante y se agregaron 250 µl de TRIzol® al precipitado y se siguió la metodología ya anteriormente descrita.

Para realizar la extracción del ARN en las bacterias en movimiento tipo swarming se tomó el extremo de la colonia de las bacterias que migraron en agar suave (0.30%) con ayuda de una asa bacteriológica, se resuspendieron en 250 µl de PBS 1X pH 7.0 estéril y posteriormente se siguió la metodología descrita para extracción de ARN previamente. De las bacterias que no migraron no se realizó extracción de ARN.

### **6.9.2 Retrotranscripción**

Partiendo del ARN obtenido se sintetizó el ADNc utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription™ (Thermo Fisher, México) siguiendo las instrucciones del fabricante (tabla 1 y 2) y haciendo las corridas en un termociclador iCycler (Bio-Rad, México).

### **6.9.3 PCR cuantitativa en tiempo real**

Una vez generado el ADNc, para la qPCR se utilizó el kit QuantiTect SYBR® Green RT-PCR (QIAGEN, México) siguiendo lo establecido en el protocolo mostrado en la tabla 1 y 2 y utilizando una concentración de 50 ng/µl de ADNc. Los genes asociados a la expresión de proteínas de choque frío que se analizaron fueron: *cspA* y *cspB*, los genes de virulencia asociados a biopelícula analizados fueron *csgA* y *csgD* y los relacionados a la movilidad “swarming” fueron *fliA*, *flhC* y *flhD* cuya secuencia de oligonucleótidos se muestra en la tabla 5. La qPCR se realizó en un termociclador PikoReal 96 (Thermo Scientific™, México).

Tabla 1. Condiciones para preparación de master mix de retrotranscripción y PCR en tiempo real.

Proceso	Componente	Concentración final
Retrotranscripción	10X RT buffer	2x
	25X dNTP Mix (100 mM)	2x
	10X RT Random Primers	2x
	MultiScribe Reverse Transcriptase	2x
	Agua libre de nucleasas	-
	ARN	200 ng/ml
PCR cuantitativa en tiempo real	2x SYBR Green PCR Master Mix	1x
	ROX	1x
	Oligonucleótido F	0.7 $\mu$ M
	Oligonucleótido R	0.7 $\mu$ M
	Agua libre de RNAsas	-
	ADNc	50 ng/ $\mu$ l

Tabla 2. Condiciones de termociclador para retrotranscripción y PCR en tiempo real.

Proceso	Condición		Temperatura (°C)	Tiempo
Retrotranscripción	Paso 1: Transcripción reversa		25	10 min
	Paso 2: Amplificación del ADN		37	120 min
	Paso 3: Elongación extra		85	5 min
	Paso 4		4	Indefinido
PCR cuantitativa en tiempo real	Paso 1: Activación		95	180 seg
	Paso 2: Desnaturalización	1	95	15 seg
		2	64	15 seg
		3	72	15 seg
	Paso 3: Extensión		72	120 seg
	Paso 4		20	10 seg

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para expresión de proteínas de choque frío, biopelícula y movilidad “swarming”

Gen	Proceso fisiológico	Secuencia 5' a 3'	Tamaño de producto	Tm
<i>cspA</i>	Proteínas de choque frío	F: CCGGTAAAATGACTGGTATCG	163 pb	64°C
		R: GAGCCATCGTCAGGAGTGAT		
<i>cspB</i>		F: GTGCATTTTTCTGCGATTCA	79 pb	64°C
		R: GCAGGACCTTTAGCACCACT		
<i>csgA</i>	Biopelícula	F: TGGCAGGTGTTGTTCCCTCAGT	146 pb	64°C
		R: GAGCCATCGTCAGGAGTGAT		
<i>csgD</i>		F: CCGCTTGTGTCCGGTTTT	97 pb	64°C
		R: GAGATCGCTCGTTCGTTGTTC		
<i>fliA</i>	Movilidad “swarming”	F: TTAGGGATCGATATTGCCGATT	70 pb	64°C
		R: CGTAGGAGAAGAGCTGGCTGTT		
<i>flhC</i>		F: CGGCAGGATTCTGGGAAAGT	173 pb	64°C
		R: CTGGACATTGGTGCGGTTTG		
<i>flhD</i>		F: ACCTCCGAGTTGCTGAAACAC	261 pb	64°C
		R: TTGCTGGAGATCGTCAACGC		

Para este ensayo, las secuencias de oligonucleótidos se diseñaron utilizando la página web “*in silico* PCR amplification” y “Primer3Plus”, tomando en consideración el contenido de GC entre 50-60%, además que las secuencias no favorecieran la formación de horquillas o fueran complementarios, buscando con ello, secuencias que amplificaran a las cepas patógenas de estudio.

Se utilizó el gen que codifica para 16S ARNr como control interno y utilizando el método  $\Delta\Delta C_t$  se determinó la expresión relativa, considerando una expresión positiva cuando los valores obtenidos estaban por encima de 1 y una expresión negativa cuando los valores estaban por debajo de 1.

#### **6.10      Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico las muestras fueron seleccionadas aleatoriamente, los datos del efecto de los compuestos polifenólicos y la temperatura se sometieron a un análisis de varianza. Las diferencias de las medias entre tratamientos se compararon usando la Prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). El análisis estadístico se realizó con el software Minitab 17 (MinitabInc, EE. UU). Los gráficos se realizaron con el programa SigmaPlot 10.0.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Actividad antimicrobiana de los compuestos polifenólicos sobre EHEC, ETEC y EPEC

De las cepas bacterianas probadas, EHEC O157:H7 fue la cepa más sensible a los compuestos polifenólicos (CP) y EPEC O111:NM la menos sensible. Metil galato fue el compuesto que presentó la mayor actividad antibacteriana seguido de GE, AT y AG.

Se determinaron la CMB de los CP de estudio, obteniendo concentraciones en un rango de 0.60 a 3.40 mg/ml, de las cuáles para ácido tánico se obtuvieron concentraciones de 2.20 a 2.80 mg/ml, 3.20 a 3.40 mg/ml de ácido gálico, 0.65 a 1.0 mg/ml de metil galato y 0.80 a 1.20 mg/ml de galato de epigallocatequina, las cepas patógenas de *E. coli* no mostraron crecimiento después de 24 h de incubación a 37°C (Tabla 4).

Tabla 4. CMB (mg/ml) para cada cepa de estudio (EHEC O157:H7, ETEC O78:H11 y EPEC O111:NM) con cada compuesto polifenólico.

Compuestos polifenólicos (CP)	<i>Escherichia coli</i> mg/ml		
	EHEC O157:H7	ETEC O78:H11	EPEC O111:NM
Ácido Tánico	2.20 ± 0.06*	2.80 ± 0.06	2.80 ± 0.07
Ácido gálico	3.20 ± 0.02	3.40 ± 0.1	3.40 ± 0.1
Metil galato	0.65 ± 0.01	0.70 ± 0.01	1.0 ± 0.03
Galato de epigallocatequina	1.20 ± 0.07	0.80 ± 0.1	0.90 ± 0.03

\*±DE

Así mismo se determinaron la concentraciones sub-inhedoras (92% de la CMB) de los CP, las cuales se encuentran en un rango de 0.50 a 3.20 mg/ml, teniendo concentraciones desde 2.10 a 2.60 mg/ml para ácido tánico, 3.10 a 3.20 mg/ml para ácido gálico, 0.50 a 0.80 mg/ml de metil galato y 0.80 a 1.0 mg/ml de galato de epigallocatequina. Para EHEC O157:H7, la sub-inhedoras de ácido tánico fue 2.60 mg/ml, 3.20 mg/ml de ácido gálico,

0.80 mg/ml de metil galato y para galato de epigallocatequina fue 1.0 mg/ml; para ETEC O78:H11 fue 2.60 mg/ml de ácido tánico, 3.20 mg/ml de ácido gálico, mientras que de metil galato y galato de epigallocatequina fue 0.80 mg/ml; y para EPEC O111:NM, 2.10 mg/ml de ácido tánico fue necesaria para inhibir el crecimiento visible de la cepa, 3.10 mg/ml de ácido gálico, 0.56 mg/ml de metil galato y 1.0 mg/ml de galato de epigallocatequina (Tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones sub-inhedoras (mg/ml) para cada cepa (EHEC O157:H7, ETEC O78:H11 y EPEC O111: NM) con cada compuesto polifenólico.

<b>Compuesto polifenólico (CP)</b>	<b><i>Escherichia coli</i> mg/ml</b>		
	O157:H7	O78:H11	O111:NM
Ácido tánico	2.10 ± 0.08*	2.60 ± 0.07	2.60 ± 0.06
Ácido gálico	3.10 ± 0.05	3.20 ± 0.1	3.20 ± 0.1
Metil galato	0.56 ± 0.01	0.60 ± 0.04	0.80 ± 0.03
Galato de epigallocatequina	1.0 ± 0.07	0.70 ± 0.07	0.80 ± 0.03

\*± DE

Una vez determinadas las concentraciones sub-inhedoras para cada patotipo, se seleccionó la concentración más alta de cada compuesto polifenólico para ser utilizada en ensayos posteriores (Tabla 6).

Tabla 6. Concentración sub-inhedoras (mg/ml) de cada CP seleccionada para EHEC O157:H7, ETEC O78:H11 y EPEC O111:NM.

<b>Compuesto polifenólico (CP)</b>	<b>Concentración sub- inhedoras (mg/ml)</b>
Ácido tánico	2.60 ± 0.06*
Ácido gálico	3.20 ± 0.1
Metil galato	0.80 ± 0.03
Galato de epigallocatequina	1.0 ± 0.07

\*± DE

## **7.2 Efecto del estrés frío y compuestos polifenólicos en la integridad de membrana de patotipos de *E. coli*.**

En estos ensayos el control de células vivas fue preparado previamente con solución de cloruro de sodio al 0.85%, mientras que el control de células muertas fue preparado con alcohol isopropílico al 70%.

En general, se encontraron diferencias ( $P < 0.05$ ) en el daño a la membrana de los patotipos de *E. coli*, causado por los CP después de un estrés frío a 10°C, cuando se compararon con las células incubadas a 37°C. El ácido tánico seguido de galato de epigallocatequina, fueron los compuestos que causaron el mayor daño a la membrana en bacterias incubadas a 10°C (50.2 y 89%, 94 y 42%, 58.4 y 78% para EHEC, ETEC y EPEC, respectivamente).

La cepa que mostró mayor resistencia a los tratamientos con los CP después de 10°C fue EHEC O157:H7 (3.1 a 50.2% de mortalidad, cuando fue tratada con metil galato y ácido tánico, respectivamente). Esta misma cepa cuando se sometió únicamente a los CP sin estrés previo, tuvo la menor mortalidad ( $P < 0.05$ ),

Por otro lado la cepa con mayor mortalidad después del estrés frío seguido de exposición a CP fue EPEC O111:NM (22.9 a 96.9 % de mortalidad, cuando fueron tratadas con ácido gálico y ácido tánico, respectivamente). Esta cepa tuvo la mayor mortalidad después de ser tratada con los CP sin estrés previo.

Para el caso de la respuesta de EHEC O157:H7 a los tratamientos, observamos el porcentaje de mortalidad de EHEC O157:H7 tratadas con AT, AG, MG, GE y su control incubadas a 37°C y 10°C. El control de EHEC (sin tratamiento por CP e incubada a 10°C) mostró 21.6% de mortalidad, mientras que el control de la cepa que no fue incubada a 10°C y sin tratamiento de CP mostró 9.5% de mortalidad. Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos (CP y temperatura) así como la interacción CP-temperatura, encontrando el mayor porcentaje de mortalidad en EHEC cuando fue tratada con ácido tánico y galato de epigallocatequina e incubada a 10°C, con 50.2% y 42.7%, respectivamente, seguido de metil galato y ácido gálico, con porcentajes de mortalidad de 9.8 y 6.2%, respectivamente. Mientras que cuando fue incubada a 37°C y tratada con galato de epigallocatequina se obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad con



15.1%, seguido de ácido tánico con 9.7%, manteniéndose igual que el control, y por debajo del control cuando fue tratada con ácido gálico y metil galato con 3.6% y 3.1% de mortalidad, respectivamente (Fig. 4).

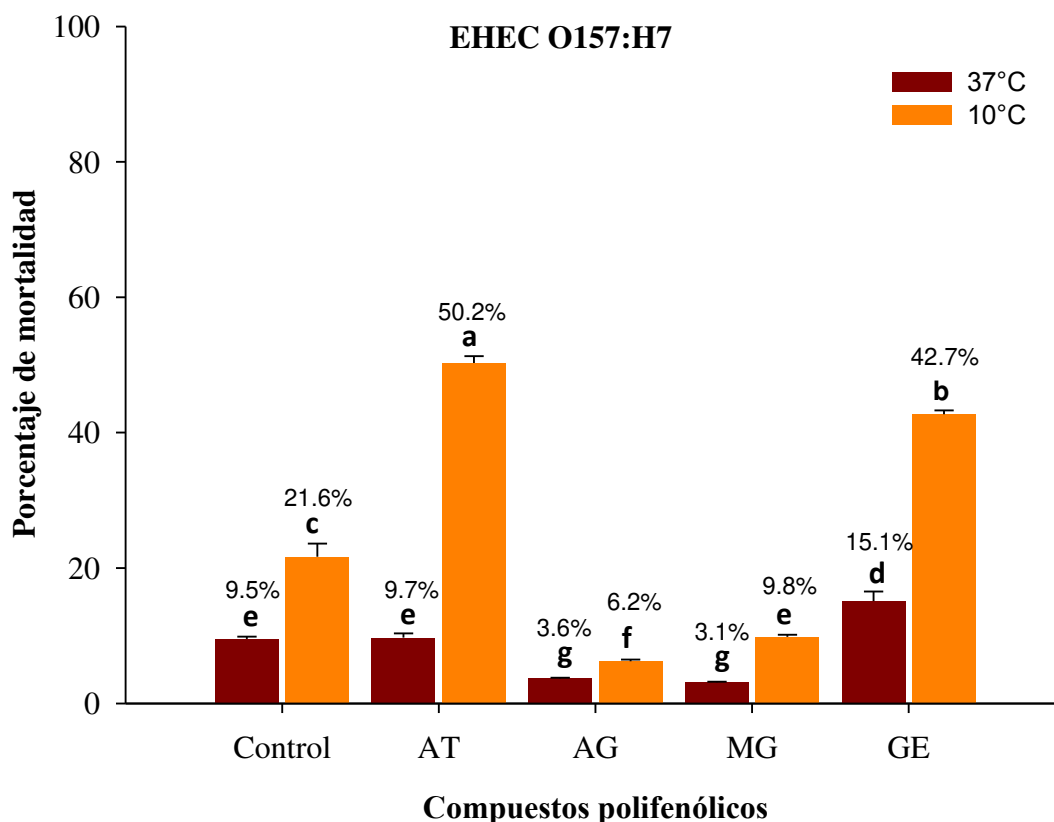


Figura 4. Porcentaje de mortalidad de EHEC O157:H7 después del tratamiento con compuestos polifenólicos (CP) e incubadas a 37°C y 10°C. Control: cepa sin CP a 37°C y 10°C. Letras diferentes representa que existe diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). AT= Ácido tánico, AG= Ácido Gálico, MG= Metil galato, GE= Galato de epigallocatequina.

Para el caso de la cepa ETEC, el control (cepa sin estrés frío y sin CP) mostró 4.9 y 30% de mortalidad cuando se incubó a 37°C y 10°C, respectivamente. Se observó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos (CP y temperatura) así como la interacción CP-temperatura, en donde, después de que ETEC se sometiera a 10°C y se tratara con ácido tánico, se obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad (89%), seguido de galato de epigallocatequina (58.4%), metil galato (46.7%) y ácido gálico con 35.4% de mortalidad, compuesto con el cual se mantuvo igual al control. De la misma manera, cuando ETEC

fue incubada a 37°C, el mayor porcentaje de mortalidad se obtuvo después del tratamiento con ácido tánico con 53%, seguido de galato de epigallocatequina con 17.1%, ácido gálico 16.7%, mientras que con metil galato se mantuvo igual que el control (Fig. 5).

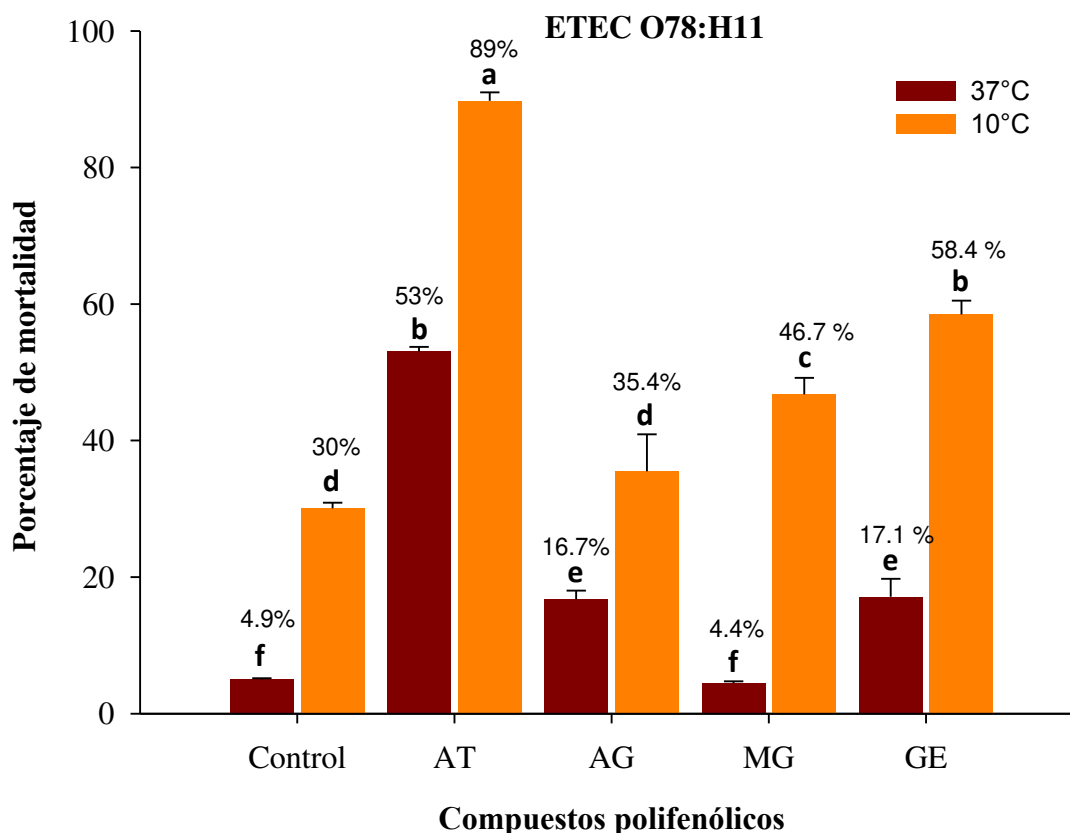


Figura 5. Porcentaje de mortalidad de ETEC O78:H11 después del tratamiento con compuestos polifenólicos (CP) e incubadas a 37°C y 10°C. Control: cepa sin CP a 37°C y 10°C. Letras diferentes representa que existe diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). AT= Ácido Tánico, AG= Ácido Gálico, MG= Metil galato, GE= Galato de epigallocatequina.

Finalmente, para la cepa EPEC O111.NM, los controles (cepa sin CP) mostraron 18.9 y 17.4% de mortalidad cuando EPEC se incubo a 37°C y 10°C, respectivamente. Encontramos diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos (CP y temperatura) así como la interacción CP-temperatura, en lo cual, el mayor porcentaje de mortalidad en EPEC después de ser expuesta a 10°C fue con ácido tánico con 94.8%, seguido de galato de epigallocatequina con 78%, metil galato con 34.2% y ácido gálico con 33.7%. Caso similar ocurrió cuando EPEC fue incubada a 37°C, y después de ser

tratada con ácido tánico se obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad con 96.9 %, seguido de galato de epigallocatequina con 45.6%, metil galato con 27.9% y ácido gálico fue el CP que causo la menor mortalidad con 22.9% (Fig. 6).

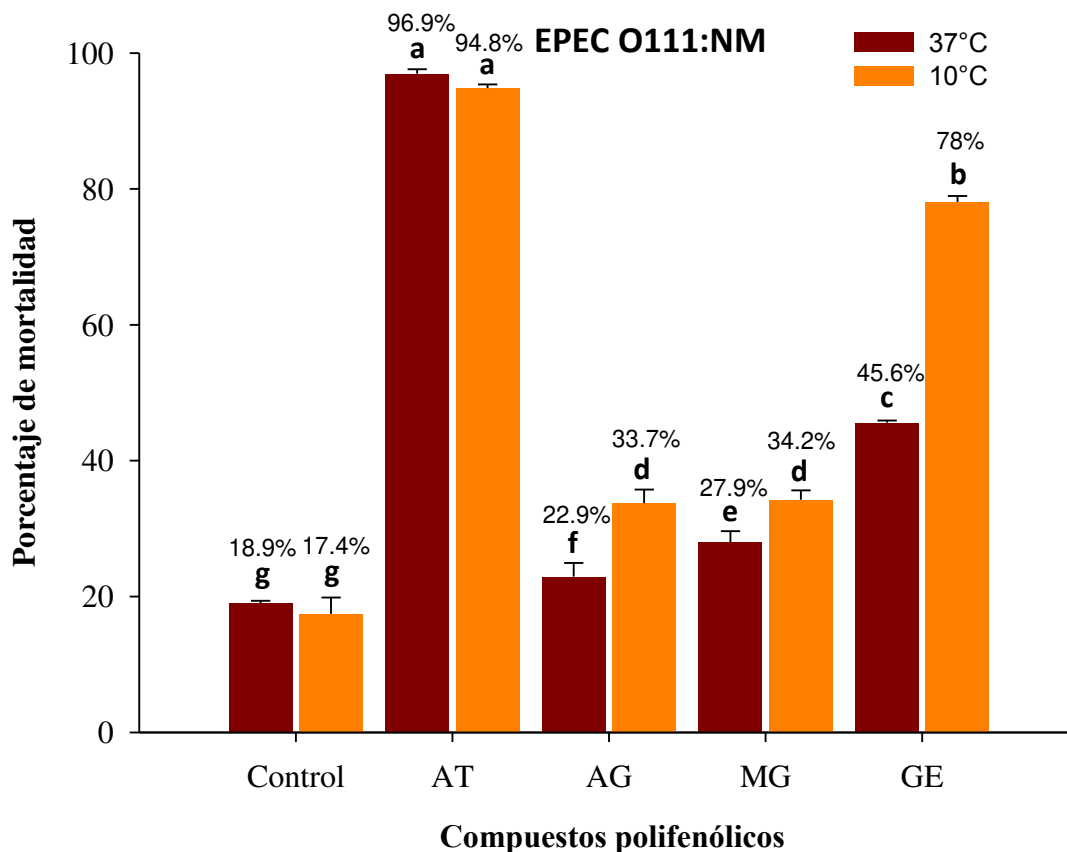


Figura 6. Porcentaje de mortalidad de EPEC O11:NM después del tratamiento con compuestos polifenólicos (CP) e incubadas a 37°C y 10°C. Control: cepa sin CP a 37°C y 10°C. Letras diferentes representa que existe diferencia significativa ( $P<0.05$ ). AT: ácido tánico, AG= Ácido gálico, MG= Metil galato, GE= Galato de epigallocatequina.

### 7.3 Efecto de estrés frío y compuestos polifenólicos en la movilidad “swarming” de patotipos de *E. coli*.

Como efecto de la temperatura a 10°C y CP se observó reducción ( $P<0.05$ ) en la movilidad “swarming” de *E. coli* O157:H7 y *E. coli* O78:H11, con diferencia estadística significativa EHEC fue la cepa más sensible al tratamiento con los CP después del estrés frío. Ácido

gálico fue el CP que permitió la mayor reducción de movilidad (100%) para ambas cepas de estudio a 37°C y 10°C, mientras que galato de epigallocatequina fue el CP que permitió la menor reducción de movilidad (65.5 y 18.6% en EHEC y 78.4% y 39.1% en ETEC, a 37°C y 10°C, respectivamente).

Los controles (sin estrés frío y sin CP) mostraron la formación de swarming característico a las 24 h de incubación, alcanzando 8 cm, mientras que los controles de estrés frío sin CP mostraron movilidad de 2.7 cm para el caso de EHEC O157:H7 y de 2.3 cm para ETEC O78:H11 después de 24 h de incubación.

Al analizar la movilidad “swarming” de EHEC O157:H7 después del tratamiento con los CP y su control incubadas a 37°C y 10°C, así como el porcentaje de reducción de la movilidad, encontramos que se observaron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos (CP y temperatura) así como la interacción CP-temperatura, posterior al estrés frío. En este caso, el ácido gálico y el metil galato mostraron la inhibición total de la movilidad de EHEC, seguido de ácido tánico (reducción de 69.7%) y, por último, galato de epigallocatequina con reducción del 18.6%. Cuando EHEC fue incubada a 37°C y tratada con ácido tánico, ácido gálico y metil galato se observó que la movilidad fue inhibida totalmente, mientras que con galato de epigallocatequina la movilidad disminuyó en 65% (Tabla 7).

Para el caso de la cepa ETEC O78:H11 tratada con los CP e incubadas a 37°C y 10°C, existieron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos (CP y temperatura), así como la interacción CP-temperatura. Después de que ETEC fue incubada a 10°C y ser tratada con ácido gálico se inhibió la movilidad (100%), seguido de metil galato con reducción de la movilidad en 73%, ácido tánico con 47% y galato de epigallocatequina con 39%. Por otro lado, la mayor reducción de la movilidad (100%) de obtuvo después de que ETEC fue incubada a 37°C y tratada con ácido tánico y ácido gálico, seguido de metil galato y galato de epigallocatequina con 86% y 78% de reducción, respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Movilidad “swarming” (cm) y porcentaje de reducción de EHEC O157:H7 y ETEC O78:H11 después del tratamiento con compuestos polifenólicos (CP) e incubadas a 37°C y 10°C. Control: cepa a 37°C y 10°C sin CP.

CP	Temperatura °C	EHEC O157:H7		ETEC O78:H11	
		Movilidad “swarming” (cm)	% reducción de movilidad	Movilidad “swarming” (cm)	% reducción de movilidad
Control	37	8.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0	8.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0
	10	3.76 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.0	2.3 ± 0.23 <sup>b</sup>	0.0
AT	37	0.0 <sup>f</sup>	100.0	0.0 <sup>g</sup>	100.0
	10	1.14 ± 0.12 <sup>e</sup>	69.7	1.22 ± 0.19 <sup>de</sup>	47.1
AG	37	0.0 <sup>f</sup>	100.0	0.0 <sup>g</sup>	100.0
	10	0.0 <sup>f</sup>	100.0	0.0 <sup>g</sup>	100.0
MG	37	0.0 <sup>f</sup>	100.0	1.12 ± 0.23 <sup>e</sup>	86.0
	10	0.0 <sup>f</sup>	100.0	0.61 ± 0.05 <sup>f</sup>	73.6
GE	37	2.76 ± 0.09 <sup>d</sup>	65.5	1.73 ± 0.09 <sup>c</sup>	78.4
	10	3.07 ± 0.08 <sup>c</sup>	18.6	1.4 ± 0.11 <sup>d</sup>	39.1

±DE. Letras diferentes representa que existe diferencia significativa (P<0.05). AT= Ácido tánico, AG= Ácido gálico, MG= Metil galato, GE= Galato de epigallocatequina.

#### 7.4 Efecto de estrés frío y compuestos polifenólicos sobre la formación de biopelícula de patotipos de *E. coli*.

Para determinar la capacidad de formar biopelícula, se determinó el IFB, y se establecieron los criterios, tal como se especificó en la sección de metodología. En este caso, todos los CP, aplicados a las cepas después del estrés frío, fueron capaces de disminuir el IFB de los tres patotipos de *E. coli*. EPEC O111:NM fue la cepa más sensible y EHEC O157:H7 la menos sensible. Metil galato fue el CP que ocasionó mayor reducción del IFB (EHEC= 0.43, ETEC= 0.35 y EPEC= 0.28) y ácido tánico, el CP con menor reducción de IFB (EHEC= 0.86, ETEC= 1.27 y EPEC= 0.64) comparados contra las cepas control.

Para el caso de EHEC O157:H7, después del tratamiento con los CP, se observó que el control (sin CP) mostró un IFB de  $1.67 \pm 0.06$  y  $1.46 \pm 0.14$  cuando fue incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  y  $10^{\circ}\text{C}$  respectivamente, comportándose como fuerte formadora de biopelícula para ambas condiciones. Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos (CP y temperatura), así como entre la interacción CP-temperatura, en donde, después de que EHEC fuera incubada a  $10^{\circ}\text{C}$  y tratada con galato de epigallocatequina se obtuvo un IFB de  $0.40 \pm 0.01$ , seguido de metil galato, ácido gálico y ácido tánico con IFB de  $0.43 \pm 0.02$ ,  $0.57 \pm 0.01$  y  $0.86 \pm 0.04$ , respectivamente, comportándose como débil formadora de biopelícula con galato de epigallocatequina, metil galato y ácido gálico y moderada formadora de biopelícula con ácido tánico. Mientras que, cuando se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  y fue tratada con metil galato se obtuvo la mayor reducción de IFB a  $0.28 \pm 0.005$ , seguido de ácido gálico, galato de epigallocatequina y ácido tánico con IFB de  $0.43 \pm 0.02$ ,  $0.69 \pm 0.006$  y  $0.87 \pm 0.01$ , respectivamente, obteniendo que con los compuestos ácido gálico y galato de epigallocatequina, EHEC se comportó como débil formadora de biopelícula y con ácido tánico como moderada (Fig. 7).

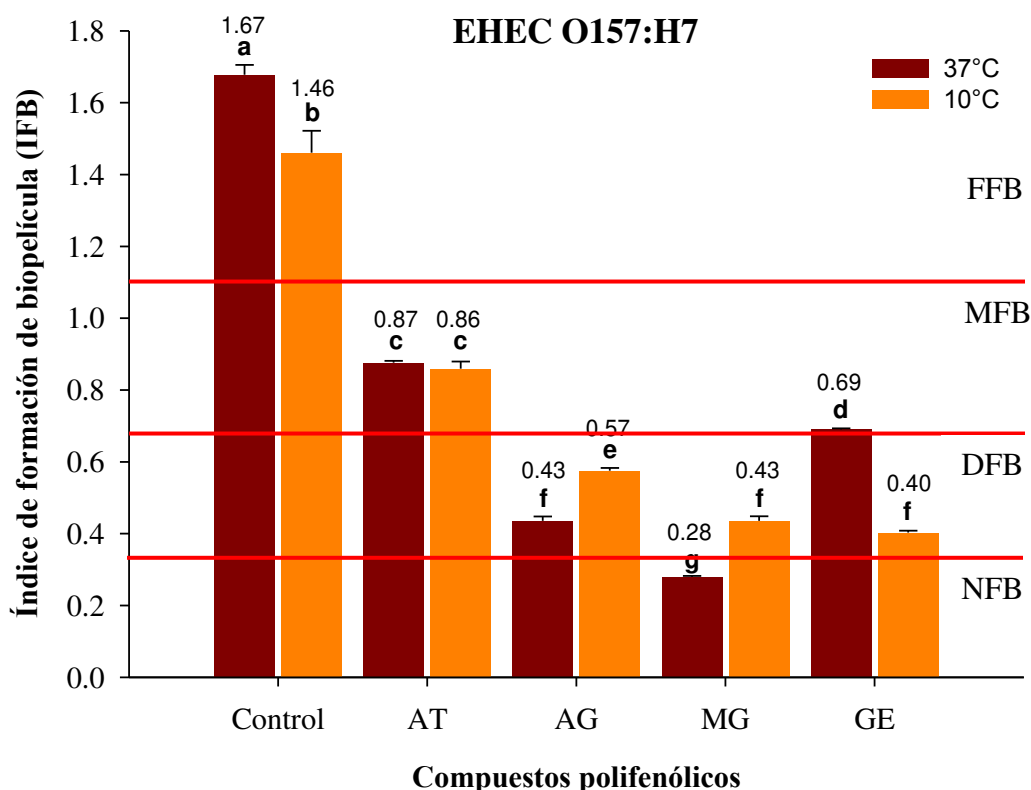


Figura 7. Índice de formación de biopelícula (IFB) de EHEC O157:H7 después del tratamiento con compuestos polifenólicos (CP) incubada a 37°C y 10°C. Control: cepa a 37°C y 10°C sin CP. Letras diferentes representan que existe diferencia significativa ( $P<0.05$ ). AT: ácido tánico, AG= Ácido gálico, MG= Metil galato, GE= Galato de epigallocatequina. FFB= Fuerte formadora de biopelícula, MFB= Moderada formadora de biopelícula, DFB= Débil formadora de biopelícula, NFB= No formadora de biopelícula.

La cepa de ETEC O78:H11, sin CP presentó un IFB de  $0.79 \pm 0.06$  y  $1.70 \pm 0.008$  cuando fue incubada a 37°C y 10°C, respectivamente, comportándose como moderada formadora de biopelícula a 37°C y fuerte formadora de biopelícula a 10°C. Entre los tratamientos (CP y temperatura) existió diferencia significativa ( $P<0.05$ ), así como en la interacción CP-temperatura, en donde la mayor reducción de IFB después de estrés frío se obtuvo con metil galato (IFB de  $0.35 \pm 0.01$ ), seguido de ácido gálico, galato de epigallocatequina y ácido tánico (IFB de  $0.46 \pm 0.02$ ,  $0.62 \pm 0.03$  y  $1.27 \pm 0.01$ , respectivamente), comportándose con ello como no formadora de biopelícula con metil galato, débil formadora de biopelícula con ácido gálico y galato de epigallocatequina y fuerte formadora

de biopelícula, similar al control, con ácido tánico. Mientras que cuando ETEC fue incubada a 37°C la mayor reducción de IFB se obtuvo cuando fue tratada con ácido gálico (IFB de  $0.05 \pm 0.004$ , no formadora), seguido de metil galato (IFB de  $0.27 \pm 0.02$ , no formadora), ácido tánico (IFB de  $0.37 \pm 0.007$ , débil formador), y por último, galato de epigallocatequina (IFB de  $0.67 \pm 0.02$ , débil formadora de biopelícula) (Fig. 8).

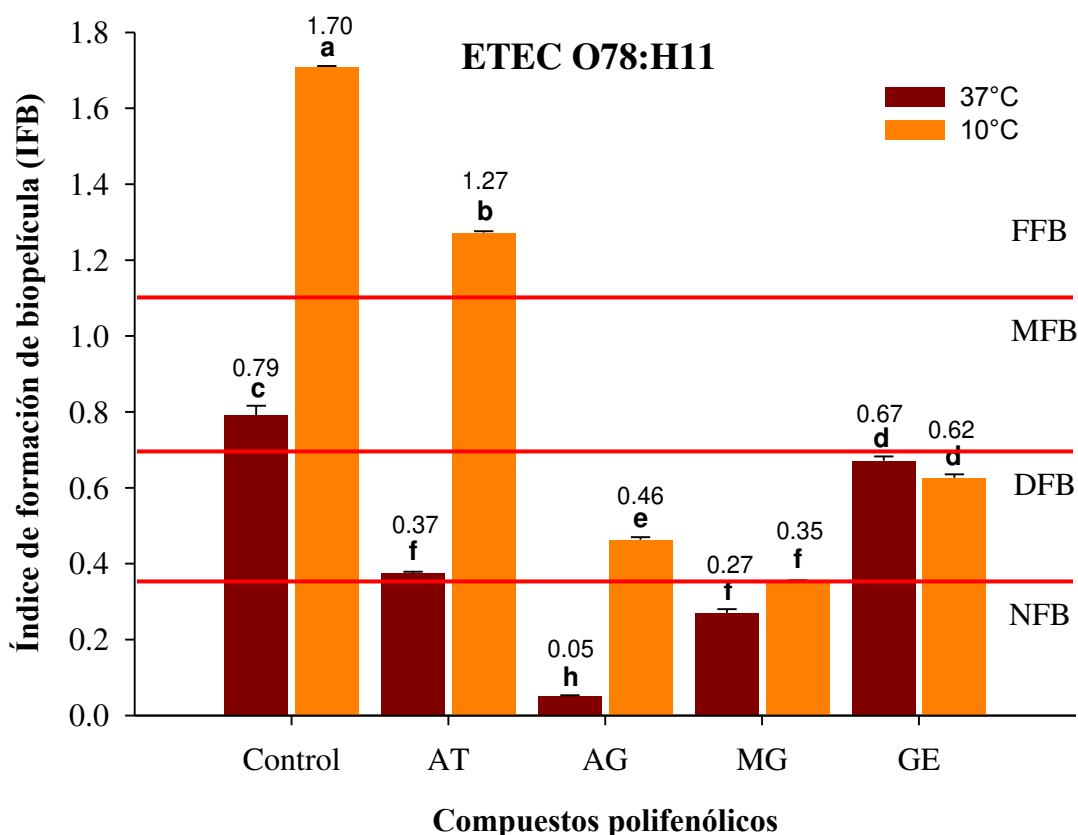


Figura 8. Índice de formación de biopelícula (IFB) de ETEC O78:H11 después del tratamiento con compuestos polifenólicos (CP) incubada a 37°C y 10°C. Control: cepa a 37°C y 10°C sin CP. Letras diferentes representan que existe diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). AT: Ácido tánico, AG= Ácido gálico, MG= Metil galato, GE= Galato de epigallocatequina. FFB= Fuerte formadora de biopelícula, MFB= Moderado formadora de biopelícula, DFB= Débil formadora de biopelícula, NFB= No formadora de biopelícula.

Finalmente para el caso de la EPEC O111:NM, el control (sin CP) presentó un IFB de  $1.25 \pm 0.20$  (fuerte formadora) y  $0.73 \pm 0.04$  (moderada formadora) cuando fue incubada a 37°C y 10°C, respectivamente.. Se observó diferencia ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos



(CP y temperatura) así como la interacción CP-temperatura, y obteniendo la mayor reducción de IFB cuando EPEC se expuso a 10°C y fue tratada con metil galato (IFB de  $0.28 \pm 0.01$  no formador), seguido de ácido gálico (IFB de  $0.38 \pm 0.01$  , débil formador), galato de epigallocatequina (IFB de  $0.48 \pm 0.02$ , débil formador) y por último ácido tánico (IFB  $0.64 \pm 0.03$ , débil formador). Mientras que, EPEC incubada a 37°C y tratada con metil galato, mostró la mayor reducción del IFB a  $0.25 \pm 0.008$  (no formador), seguido de ácido gálico (IFB=  $0.33 \pm 0.006$ , no formador), galato de epigallocatequina (IFB=  $0.55 \pm 0.02$ , débil formadora) y ácido tánico (IFB=  $0.76 \pm 0.04$ , moderada formadora) (Fig. 9).

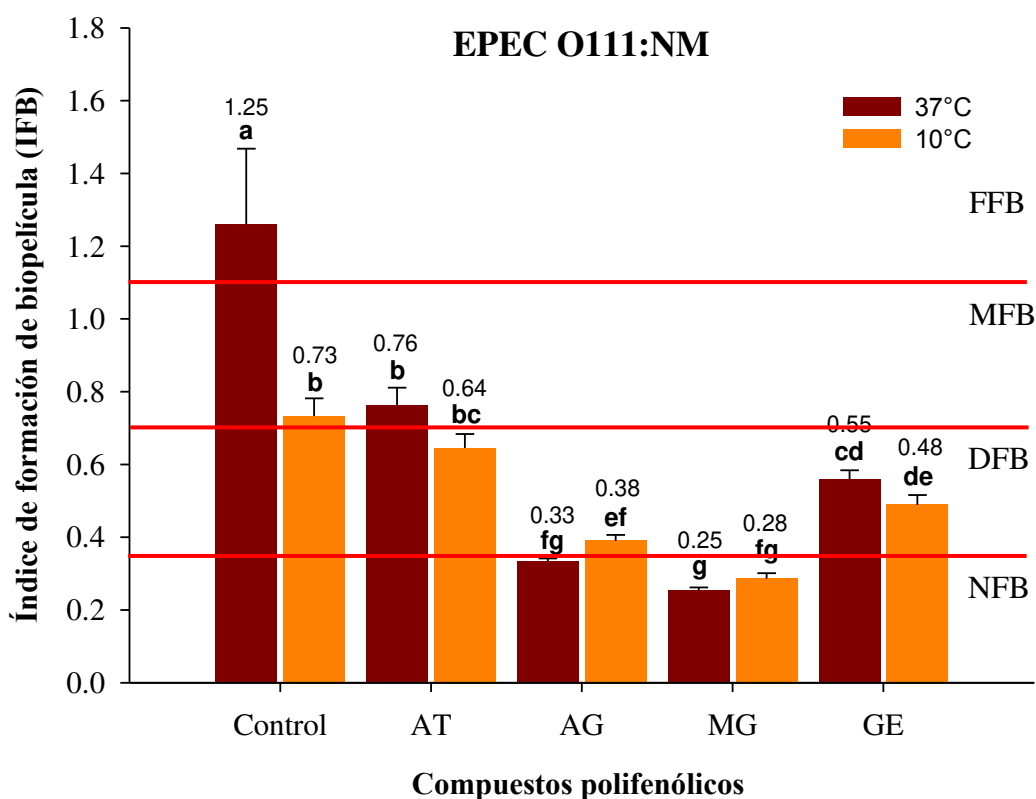


Figura 9. Índice de formación de biopelícula (IFB) de EPEC O111:NM después del tratamiento con compuestos polifenólicos (CP) incubada a 37°C y 10°C. Control: cepa a 37°C y 10°C sin CP. Letras diferentes representan que existe diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). AT: Ácido tánico, AG= Ácido gálico, MG= Metil galato, GE= Galato de epigallocatequina. FFB= Fuerte formadora de biopelícula, MFB= Moderada formadora de biopelícula, DFB= Débil formadora de biopelícula, NFB= No formadora de biopelícula.

### **7.5 Efecto del estrés frío y compuestos polifenólicos en la expresión de genes de proteínas de choque frío de patotipos de *E. coli*.**

La expresión de genes de proteínas de choque frío (*csp*) A y B fueron analizados seguidos del tratamiento con los CP en EHEC, ETEC y EPEC, comparando la respuesta con la expresión del gen normalizador rRNA 16S.

Cuando se estudió la expresión del gen *cspA*, ETEC fue la cepa más sensible al frío y el tratamiento con los CP y EPEC la menos sensible. En EHEC, después del estrés frío, y expuesta a ácido tánico hubo sobre-expresión del gen *cspA*, mientras que con ácido gálico, metil galato y galato de epigallocatequina, se reprimió el gen ( $P < 0.05$ ). De la misma manera, este gen se reprimió cuando EHEC no fue sometida a estrés frío, pero si al tratamiento con los CP, encontrando que incluso cuando se trató con ácido tánico y ácido gálico, los niveles del gen *cspA* no fueron detectados (Tabla 8).

En ETEC después del estrés frío y el tratamiento con ácido tánico, ácido gálico y metil galato, hubo represión del gen *cspA* hasta niveles no detectados, sin embargo, cuando se expuso a galato de epigallocatequina, este gen se sobre-expresó hasta 150 veces. Por otro lado, cuando ETEC únicamente se sometió a los CP, no se detectó expresión de este gen. En el caso del patotipo EPEC, el estrés frío y tratamiento con ácido tánico, ácido gálico y galato de epigallocatequina, provocó la represión del gen en niveles de 0.8, 0.9 y 0.1 veces, respectivamente, sin embargo, con metil galato se sobre-expresó 2.5 veces ( $P < 0.05$ ). Este gen también mostró sobre-expresión cuando EPEC únicamente se trató con los CP, obteniendo expresión 2.0 veces más con ácido tánico, 10.27 veces con ácido gálico, 7.5 veces con metil galato y 5.4 veces con galato de epigallocatequina (Tabla 8).

Cuando analizamos la expresión del gen *cspB*, EHEC, no mostró diferencias significativas de expresión después del estrés frío y el tratamiento con ácido tánico, metil galato y galato de epigallocatequina, pero si se reprimió 0.1 veces y 0.3 veces con ácido gálico; mientras que, EHEC sin estrés frío y el tratamiento con ácido tánico, ácido gálico y galato de epigallocatequina sobre-expresó el gen hasta 0.03, 1.3 y 450 veces, y metil galato lo reprimió 0.24 veces.

En el caso de ETEC, este gen se reprimió 0.9 veces como respuesta a la exposición del estrés frío y tratamiento con los cuatro CP; lo mismo que cuando ETEC se expuso únicamente a los CP, (represión de hasta 0.9 veces), no observando diferencia significativa ( $P>0.05$ ) entre los CP. EPEC después de someterse a estrés frío y los CP, provocó la represión del gen 0.9 veces, con excepción del tratamiento con ácido tánico, en donde no se detectó expresión de este gen. De la misma manera, la expresión del gen se reprimió 0.9 veces, cuando EPEC no se sometió a estrés frío, pero si a los cuatro CP (Tabla 8).

Tabla 8. Expresión del gen *cspA* y *cspB* de los tres patotipos de *E. coli* después del tratamiento con los compuestos polifenólicos (CP) e incubadas a 37°C y 10°C.

CP	T (°C)	<i>cspA</i>			<i>cspB</i>		
		EHEC O157:H7	ETEC O78:H11	EPEC O111:NM	EHEC O157:H7	ETEC O78:H11	EPEC O111:NM
<b>Control</b>	37	1 <sup>cde</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>cde</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
	10	1 <sup>cde</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>cde</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
<b>AT</b>	37	*ND	-0.99 ± 6.3e-6 <sup>b</sup>	2.03 ± 0.66 <sup>cd</sup>	0.03 ± 0.15 <sup>b</sup>	-0.99 ± 5.16E-5 <sup>b</sup>	-0.97 ± 0.03 <sup>cd</sup>
	10	657 ± 6.39 <sup>de</sup>	*ND	-0.83 ± 0.08 <sup>de</sup>	-0.99 ± 0.008 <sup>b</sup>	-0.97 ± 0.008 <sup>b</sup>	*ND
<b>AG</b>	37	*ND	*ND	10.27 ± 2.0 <sup>a</sup>	1.31 ± 0.61 <sup>b</sup>	-0.96 ± 0.01 <sup>b</sup>	-0.96 ± 0.003 <sup>cd</sup>
	10	-0.98 ± 0.001 <sup>e</sup>	*ND	-0.98 ± 0.004 <sup>e</sup>	-0.75 ± 0.18 <sup>b</sup>	-0.88 ± 0.14 <sup>b</sup>	-0.95 ± 0.023 <sup>e</sup>
<b>MG</b>	37	-0.74 ± 0.16 <sup>ab</sup>	*ND	7.56 ± 1.6 <sup>ab</sup>	-0.24 ± 0.19 <sup>b</sup>	-0.99 ± 0.0002 <sup>b</sup>	-0.98 ± 0.012 <sup>cd</sup>
	10	-0.15 ± 0.24 <sup>e</sup>	*ND	2.53 ± 0.9 <sup>e</sup>	-0.98 ± 0.007 <sup>b</sup>	-0.95 ± 0.01 <sup>b</sup>	-0.96 ± 0.009 <sup>cd</sup>
<b>GE</b>	37	-0.52 ± 0.15 <sup>b</sup>	*ND	5.49 ± 1.3 <sup>b</sup>	451 ± 7.6 <sup>a</sup>	-0.99 ± 0.0002 <sup>b</sup>	-0.99 ± 0.001 <sup>d</sup>
	10	-0.45 ± 0.11 <sup>cde</sup>	159 ± 8.4 <sup>b</sup>	-0.14 ± 0.17 <sup>cde</sup>	-0.99 ± 0.002 <sup>b</sup>	-0.93 ± 0.04 <sup>b</sup>	-0.99 ± 0.004 <sup>d</sup>

\*ND: No detectado. ±DE. Letras diferentes representan que existe diferencia significativa (P<0.05). T= Temperatura, AT= Ácido tánico, AG= Ácido gálico, MG= Metil galato, GE= Galato de epigallocatequina.

### **7.6 Efecto del estrés frío y compuestos polifenólicos en la expresión de genes de virulencia relacionados a biopelícula y swarming de patotipos de *Escherichia coli*.**

La expresión de genes de virulencia relacionados a la formación de biopelícula analizados fue *csgA*, el cual codifica la subunidad principal de curlina, implicada en el proceso de adherencia a las superficies por parte de *E. coli* y *csgD*, un regulador transcripcional, fue analizada después del estrés frío y ser tratados con los CP en EHEC, ETEC y EPEC, comparando la respuesta con la expresión del gen normalizador rRNA 16S.

En general se observa que la expresión del gen *csgA* se reprimió en los tres patotipos de *E. coli* después de ser tratadas con los CP e incubadas a 37°C y 10°C. Para EHEC, con y sin estrés frío, el gen se reprimió hasta 0.9 veces después del tratamiento con los CP, sin diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). La misma situación se observó en ETEC, donde también hubo represión del gen sin diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre los CP. Así mismo, para EPEC, la expresión del gen también se mostró reprimida incluso a niveles no detectados cuando se sometió a estrés frío y los CP (Tabla 9).

La respuesta de expresión del gen *csgD* de los tres patotipos de *E. coli* también fue analizada, observando en general una represión. En EHEC el gen se reprimió incluso hasta niveles no detectados después del estrés frío y el tratamiento con ácido tánico y ácido gálico. Sin embargo, para ETEC hubo una sobre-expresión del gen cuando fue sometida a estrés frío y el tratamiento con ácido gálico y metil galato (6.5 y 3.4 veces, respectivamente). En EPEC, la expresión del gen se reprimió cuando se incubó a 37 y 10°C y se expuso al tratamiento con los CP, aunque sin diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre los CP, excepto cuando fue tratada únicamente con ácido gálico, el gen se sobre-expreso 2.1 veces (Tabla 9).

Tabla 9. Expresión del gen *csgA* y *csgD* de los tres patotipos de *E. coli* después del tratamiento con los compuestos polifenólicos (CP) incubadas a 37°C y 10°C.

CP	T (°C)	<i>csgA</i>			<i>csgD</i>		
		EHEC O157:H7	ETEC O78:H11	EPEC O111:NM	EHEC O157:H7	ETEC O78:H11	EPEC O111:NM
<b>Control</b>	37	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>c</sup>	1 <sup>b</sup>
	10	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>c</sup>	1 <sup>b</sup>
<b>AT</b>	37	-0.99 ± 0.001 <sup>c</sup>	-0.99 ± 0.0009 <sup>d</sup>	-0.93 ± 0.01 <sup>c</sup>	-0.83 ± 0.02 <sup>de</sup>	-0.85 ± 0.04 <sup>c</sup>	-0.64 ± 0.01 <sup>d</sup>
	10	-0.95 ± 0.01 <sup>c</sup>	-0.99 ± 3.8E-4 <sup>d</sup>	*ND	*ND	-0.78 ± 0.08 <sup>c</sup>	-0.99 ± 0.0001 <sup>e</sup>
<b>AG</b>	37	-0.98 ± 0.003 <sup>c</sup>	-0.96 ± 0.002 <sup>c</sup>	-0.27 ± 0.63 <sup>b</sup>	0.54 ± 0.32 <sup>b</sup>	-0.92 ± 0.02 <sup>c</sup>	2.11 ± 0.16 <sup>a</sup>
	10	-0.86 ± 0.01 <sup>b</sup>	-0.92 ± 0.01 <sup>b</sup>	*ND	*ND	6.5 ± 1.8 <sup>a</sup>	-0.96 ± 0.005 <sup>e</sup>
<b>MG</b>	37	-0.99 ± 0.0002 <sup>c</sup>	-0.99 ± 0.0007 <sup>d</sup>	-0.99 ± 0.004 <sup>c</sup>	-0.61 ± 0.17 <sup>d</sup>	-0.95 ± 0.02 <sup>c</sup>	-0.64 ± 0.06 <sup>d</sup>
	10	-0.94 ± 0.06 <sup>c</sup>	-0.99 ± 0.001 <sup>d</sup>	*ND	-0.88 ± 0.07 <sup>de</sup>	3.46 ± 1.11 <sup>b</sup>	-0.98 ± 0.002 <sup>e</sup>
<b>GE</b>	37	-0.99 ± 0.0001 <sup>c</sup>	-0.99 ± 0.001 <sup>d</sup>	-0.99 ± 5.9E-5 <sup>c</sup>	-0.94 ± 0.02 <sup>de</sup>	-0.93 ± 0.01 <sup>c</sup>	-0.4 ± 0.10 <sup>c</sup>
	10	-0.99 ± 0.0003 <sup>c</sup>	-0.99 ± 0.0002 <sup>d</sup>	*ND	-0.96 ± 0.004 <sup>de</sup>	-0.67 ± 0.03 <sup>c</sup>	-0.99 ± 0.0004 <sup>e</sup>

\*ND: No detectado. ±DE. Letras diferentes representan que existe diferencia significativa (P<0.05). T= Temperatura, AT=Ácido tánico, Ácido gálico, MG= Metil galato, GE= Galato de epigallocatequina.

Así mismo, se evaluaron los genes de virulencia relacionados a la movilidad “swarming” (*fliA* y *flhD*, genes relacionados con la biosíntesis de flagelo, *flhC*, regulador transcripcional). Estos genes, al igual que los genes de virulencia de biopelícula, fueron analizados seguidos del estrés frío y el tratamiento con los CP en EHEC, ETEC y EPEC, comparando la respuesta en la expresión con el gen normalizador rRNA 16S.

Para la expresión del gen *fliA* de los dos patotipos de *E. coli* analizados, se encontró que la expresión del gen en EHEC se sobre-expreso después del frío y ácido tánico y cuando únicamente fue tratada con galato de epigallocatequina. Por otro lado, ETEC, mostró niveles de sobre-expresión con y sin estrés frío y únicamente hubo represión del gen después del frío y el tratamiento con metil galato (Tabla 10).

En cuanto a la expresión del gen *flhC*, de los dos patotipos de *E. coli* se obtuvo que la expresión del gen para EHEC se reprimió con estrés frío y el tratamiento con galato de epigallocatequina, mientras que después del estrés frío y ácido tánico el gen se sobre-expreso. Para ETEC, el gen se sobre-expreso únicamente después del tratamiento con metil galato, galato de epigallocatequina y cuando fue incubada a 10°C y con galato de epigallocatequina (tabla 10).

Para el caso de la expresión del gen *flhD* de los dos patotipos de *E. coli*, en EHEC el gen se sobre-expresó después del estrés frío y de ser sometida a ácido tánico y galato de epigallocatequina (9.8 y 1.8 veces, respectivamente), la misma situación se observó en ETEC con y sin estrés frío y el tratamiento con metil galato y galato de epigallocatequina, mientras que el gen fue reprimido después del estrés frío y ácido tánico (Tabla 10).

Tabla 10. Expresión del gen *fliA*, *flhC* y *flhD* de los dos patotipos de *E. coli* después del tratamiento con los compuestos polifenólicos (CP) incubadas a 37°C y 10°C.

CP	T (°C)	<i>fliA</i>		<i>flhC</i>		<i>flhD</i>	
		EHEC O157:H7	ETEC O78:H11	EHEC O157:H7	ETEC O78:H11	EHEC O157:H7	ETEC O78:H11
Control	37	1 <sup>b</sup>	1 <sup>cd</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup>
	10	1 <sup>b</sup>	1 <sup>cd</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup>
AT	37	*NA	*NA	*NA	*NA	*NA	*NA
	10	5.1 ± 1.98 <sup>a</sup>	1.01 ± 1.8 <sup>cd</sup>	1.93 ± 0.98 <sup>a</sup>	-0.58 ± 0.04 <sup>b</sup>	9.86 ± 0.74 <sup>a</sup>	-0.02 ± 0.16 <sup>c</sup>
AG	37	*NA	*NA	*NA	*NA	*NA	*NA
	10	*NA	*NA	*NA	*NA	*NA	*NA
MG	37	*NA	2.49 ± 0.73 <sup>c</sup>	*NA	10.94 ± 0.48 <sup>a</sup>	*NA	6.89 ± 1.13 <sup>b</sup>
	10	*NA	-0.75 ± 0.14 <sup>d</sup>	*NA	-0.49 ± 0.19 <sup>b</sup>	*NA	1.69 ± 0.83 <sup>c</sup>
GE	37	0.43 ± 1.23 <sup>b</sup>	28.7 ± 2.8 <sup>a</sup>	-0.7 ± 0.005 <sup>c</sup>	10.4 ± 2.72 <sup>a</sup>	-0.67 ± 0.03 <sup>d</sup>	11.2 ± 2.09 <sup>a</sup>
	10	-0.10 ± 0.24 <sup>b</sup>	6.55 ± 0.41 <sup>b</sup>	-0.55 ± 0.10 <sup>c</sup>	11.19 ± 1.5 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.33 <sup>b</sup>	12.7 ± 0.54 <sup>a</sup>

\*NA: No analizado. ±DE. Letras diferentes representan que existe diferencia significativa (P<0.05). T= Temperatura, AT= Ácido tánico, AG= Ácido gálico, MG= Metil galato, GE= Galato de epigallocatequina.



## 8. DISCUSIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son un problema importante de salud pública en todo el mundo aumentando su incidencia en los últimos 20 años. La mayoría de las ETAs son causadas por el consumo de alimentos o agua contaminada con microorganismos patógenos y/o sus toxinas, en donde se han identificado 31 patógenos, siendo las bacterias los principales agentes causantes de hospitalización y muerte (Law et al. 2014), particularmente *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* (Barba et al. 2017).

Diversos estudios se centran en enfrentar la acción de patógenos relacionados con los alimentos y prolongar su vida útil. Diferentes métodos y tecnologías de conservación de alimentos, tales como acidificación, secado y/o tratamiento térmico, se han desarrollado con la finalidad de cumplir las demandas de los consumidores respecto a seguridad microbiológica, valor nutricional y propiedades sensoriales de los alimentos (Pisoschi et al. 2018, Lucera et al. 2012). En los últimos años, debido a la preocupación del consumidor respecto a los aditivos químicos o sintéticos, los compuestos naturales como antimicrobianos han adquirido gran interés pudiéndose agregar de manera directa en la formulación del producto, recubrirse en su superficie o incorporarse en el producto. Los beneficios que se consiguen con los antimicrobianos naturales (los cuales son obtenidos de plantas, animales, bacterias, algas y hongos), son debido a compuestos como compuestos fenólicos, terpenos y taninos (Lucera et al. 2012).

Para la conservación de los alimentos, uno de los aspectos fundamentales es el control de los microorganismos, aplicando tratamientos intensos que garantizan su seguridad, sin embargo, también implican pérdidas adicionales en la calidad de los alimentos. En muchos casos, la destrucción bacteriana no es necesaria para la conservación de los alimentos ya que controlar factores que puedan afectar la viabilidad puede ser suficiente para inhibir el crecimiento microbiano (Beales 2004).

La temperatura fría es un método de conservación utilizada desde tiempo atrás, sin embargo, este método no siempre elimina los microorganismos, ya que en la mayoría de los casos reduce el metabolismo microbiano (Vaclavik y Christian 2014). A pesar de esto,

el enfriamiento rápido de los productos alimenticios es una técnica importante utilizada para mantener la calidad y seguridad de los alimentos. Anteriormente no se había tomado conciencia de que la exposición a un choque frío podía potenciar la sobrevivencia de microorganismos como *E. coli* en los propios alimentos. Bollman et al. (2001), analizaron la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 al choque frío (10°C durante 1.5 h) en lácteos, huevos y embutidos crudos (salchicha) así como en carne de res, sus resultados mostraron un aumento significativo en la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en los lácteos, mientras que en la carne no se mostró diferencia significativa.

Yu et al. (2001), estudiaron la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en fresas, obteniendo que la bacteria podía sobrevivir a 23, 10, 5 y -20°C hasta por tres días dentro de la fruta, detectando la mayor reducción bacteriana cuando la bacteria se incubó a -20°C.

Por otro lado, los polifenoles son metabolitos secundarios distribuidos en las plantas que juegan un papel importante como defensa contra patógenos y en respuesta a varias condiciones de estrés abiótico en plantas. Su estructura química comprende un anillo aromático, portando uno o más grupos hidroxilo (-OH), que pueden ser desde moléculas fenólicas simples hasta compuestos altamente polimerizados, generalmente dividiéndose en flavonoides y no flavonoides (Daglia 2012, Nitiema et al. 2012). La acción inhibitoria es atribuida al grupo -OH ya que puede interactuar con la membrana celular de la bacteria para destruir la estructura de la membrana y causar pérdida de los componentes celulares (Gyawali y Ibrahim 2014).

El potencial antimicrobiano y antioxidante de estas moléculas hace que el compuesto sea más efectivo para la conservación de alimentos. Estos compuestos por lo general, además de poseer actividad antibacteriana, presentan capacidad antioxidante, completando los beneficios farmacológicos de dichos extractos (Pisoschi et al. 2018).

Los flavonoides están compuestos de un esqueleto de carbono de difenil propanos, dos anillos de benceno que están unidos por una cadena lineal de tres carbonos, en donde la cadena central forma un anillo pirano con un anillo de benceno. Los no flavonoides corresponden a ácidos fenólicos, los cuales pueden subdividirse en derivados del ácido

benzoico, tales como ácido gálico y los derivados del ácido cinámico, principalmente ácido cumárico, cafeico y ferúlico (Daglia 2012).

Los taninos se subdividen en proantocianidinas (o también llamadas taninos condensados), galotaninos y elagitaninos (taninos hidrolizables), representan uno de los principales grupos de compuestos polifenólicos, además de que reciben la mayor atención debido a su amplio espectro y actividad antimicrobiana capaces de afectar a bacterias Gram positivas y negativas, suprimiendo factores de virulencia como inhibición de formación de biopelículas, neutralización de toxinas bacterianas o ya sea penetrando e interactuando con las bicapas lipídicas, así mismo pueden causar la fusión de membrana, proceso que dará como resultado fuga de materiales intramembranales y agregación bacteriana (Slobodníková et al. 2016). Dentro de este grupo se encuentra el ácido tánico, un tanino hidrolizable, el cual comprende una mezcla de ésteres de glucosas del ácido gálico. Este compuesto es considerado más potente contra bacterias Gram positivas que frente a Gram negativas, factor a considerar ya que en este trabajo se analizaron tres bacterias patógenas Gram negativas, y en donde la disminución del efecto antimicrobiano se debe a la presencia del lipopolisacárido (LPS) presente en estas bacterias, el cual se considera que tiene un efecto protector contra estos compuestos (Min et al. 2007).

En nuestra investigación probamos la actividad de los CP (AT, AG, MG y GE) sobre diversos aspectos fisiológicos de tres patotipos de *E. coli* (EHEC, EPEC y ETEC) posterior a un estrés por frío (10°C por 4h). Encontramos que las CMI variaron dependiendo de la cepa y el compuesto. Encontramos que para los 3 patotipos la CMI para el ácido gálico fue la mas alta (3.10 a 3.20 mg/ml), en tanto que las CMI más bajas fueron después del tratamiento con metil galato (0.50 a 0.80 mg/ml).

Previamente Boulekbache-Makhlouf et al. (2013), utilizaron una concentración de 0.30 a 2.0 mg/ml de ácido tánico para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas, sin embargo, en nuestro trabajo al utilizar este compuesto fue necesario 2.60 mg/ml para afectar el crecimiento de *E. coli*. Estas diferencias se pueden deber a que la pared celular de las bacterias Gram positivas difiere de las Gram negativas (Min et al. 2007), en donde el LPS de Gram negativas actúa como barrera protectora frente al compuesto. Así mismo se ha reportado que el ácido tánico también funciona como sideróforo para quelar el hierro

del medio haciendo que no esté disponible para los microorganismos (Chung et al. 1998). Existe evidencia de que los taninos pueden interrumpir la integridad de la membrana, inhibiendo procesos celulares como fosforilación oxidativa y de transporte dentro y fuera de la célula, además es posible que el ácido tánico pueda interactuar con estructuras extracelulares como las fimbrias (Smith et al. 2005).

Con respecto a los otros compuestos polifenólicos probados, se ha demostrado que poseen propiedades antimicrobianas en bacterias Gram positivas y Gram negativas, principalmente, AG y GE. En nuestro estudio, el GE fue el segundo compuesto con mayor actividad antimicrobiana en los tres patotipos de *E. coli*, incluso concentraciones menores a la CMB (0.70-0.80 mg/ml) mostraron efecto en el crecimiento de ETEC y EPEC. El GE, que se encuentra en el extracto de té verde, ha demostrado tener una poderosa actividad antimicrobiana debido principalmente al residuo galoil (Pisoschi et al. 2018), siendo las bacterias Gram positivas más sensibles que las Gram negativas, permitiendo que se vea limitado el crecimiento bacteriano y por lo tanto la invasión. Sin embargo, se ha reportado que las EHEC son susceptibles al GE (0.05 mg/ml) (Steinmann et al. 2013), tal como encontramos en nuestro estudio.

A diferencia de nuestros resultados, las bacterias Gram negativas suelen ser menos susceptibles a GE, debido a que el modo de acción de este compuesto es unirse al peptidoglicano, y ya que este compuesto en las bacterias Gram negativas se encuentra protegido por una membrana externa, compuesta por LPS de carga negativa, se ha pensado que la afinidad del GE (cargado negativamente) fuera reducida por la repulsión de cargas, reduciéndose la actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram negativas (Steinmann et al. 2013).

Cabe mencionar que específicamente para EHEC, Sugita-Konishi et al. (1999) demostraron que incluso a concentraciones muy bajas (0.05 mg/ml) de GE se puede inhibir la liberación de la toxina shiga y los autores sugieren que el residuo galoil en la posición 3-OH y el grupo OH son necesarios para suprimir la liberación de las toxinas, ayudando con ello a que la virulencia de EHEC sea menor. En otro estudio se demostró que la concentración necesaria para inhibir el crecimiento (90%) de EHEC O157:H7, fue de 0.10 mg/ml, mientras que concentraciones sub-letales (0.025 mg/ml), mostraba efectos

antipatogénicos significativos, afectando algunos factores de virulencia tales como formación de biopelícula y la movilidad bacteriana tipo swarming (Daglia 2012), sin afectar el crecimiento bacteriano.

El AG en este trabajo, una concentración de 3.20 mg/ml fue bactericida para EHEC, ETEC y EPEC, lo cual difiere con lo reportado por Sarjit et al. (2015) quienes encontraron que concentraciones superiores a 1.0 mg/ml eran bactericidas para las *E. coli* probadas. De la misma manera, Borges et al. (2013b), encontraron que 1.5 mg/ml de AG fue necesario para inhibir el crecimiento de *E. coli*. Aunque en nuestro caso se debe tomarse en cuenta que los patotipos aquí probados ya habían tenido una preexposición al frío.

El AG es un ácido fenólico derivado del ácido benzoico, cuyo mecanismo de acción es principalmente desestabilización y permeabilización de la membrana citoplasmática, así como inhibición enzimática por oxidación de productos, posiblemente mediante reacción con grupos sulfhídricos o interacciones no específicas con proteínas, además que los ácidos fenólicos también pueden inhibir la síntesis de los ácidos nucleicos. El AG es capaz de cambiar la hidrofobicidad de la bacteria, modificando con esto la capacidad de aceptar electrones, permitiéndole interactuar con los componentes de la membrana bacteriana. Debido a su carácter lipófilo puede atravesar la membrana celular por difusión pasiva en la forma no disociada del ácido, alterando con ello la estructura de la membrana celular y posiblemente acidificando el citoplasma llevando a la desnaturalización de proteínas (Borges et al. 2012),.

Finalmente, cuando sometimos a los patotipos de *E. coli* al MG posterior al estrés frío, encontramos que una concentración de 0.80 mg/ml fue capaz de inhibir el crecimiento de las cepas analizadas. Los galotaninos, particularmente MG poseen actividades inhibitorias contra bacterias Gram negativas, teniendo como mecanismo de acción inhibición en la replicación bacteriana por afectación de la enzima citocromo oxidasa y/o las ATPasas (Choi et al. 2014). Kang et al. (2008), examinaron la habilidad de este compuesto para inhibir la proliferación y la biopelícula de microorganismos Gram positivos (*Streptococcus mutans*), encontrando que a 1.0 mg/ml se inhibe el crecimiento y la formación de biopelícula. Mientras que, en nuestro trabajo fue capaz de inhibir el crecimiento de patógenos Gram negativos, a concentraciones menores (0.80 mg/ml) que

las señaladas por dicho autor. Aunque ya se conoce el efecto que MG puede tener sobre bacterias Gram negativas como *Salmonella* y *Enterobacter*, se sabe que puede causar una hiperpolarización de la membrana, y con ello daño en la integridad de esta misma y cambios fisiológicos que dirigen a una reducción del pH de estas bacterias (Sánchez et al. 2013).

Ya se ha demostrado la eficacia de MG en combinación con antibióticos convencionales contra enteropatógenos como *Salmonella*; Choi et al. (2014), estudiaron que concentraciones de entre 3.9 a 125 mg/ml de MG reducía notablemente las CMI de ciprofloxacina contra *Salmonella*, remarcando con ello un efecto sinérgico entre metil galato y ciprofloxacina contra patógenos de alimentos.

Los cuatro compuestos polifenólicos probados contra *E. coli* lograron inhibir el crecimiento bacteriano a concentraciones en el rango de 0.50 a 3.5 mg/ml, siendo MG y GE los más efectivos ya que se requiere de menor concentración de dichos compuestos para inhibir el crecimiento bacteriano.

Cuando analizamos el efecto de los CP sobre aspectos fenotípicos como formación de biopelículas, encontramos que las cepas estudiadas después de ser expuestas a 10°C y tratadas con AT, AG, MG y GE, fueron capaces de reducir la formación de biopelícula. Para este caso, el ME fue el compuesto más activo para inhibir la formación de biopelícula de EPEC, EHEC y ETEC (IFB <0.27), mientras que AT fue el que menos redujo la formación de biopelícula (IFB >0.34). Cuando se agregó AG la capacidad de formación de biopelícula por las cepas cambió a débil lo cual no concuerda a lo reportado previamente por Borges et al. (2012) al establecer que en presencia de AG, *E. coli* se comporta como moderada formadora de biopelícula, sin embargo, en este ensayo los autores no sometieron a las cepas a estrés frío lo que puede influenciar la respuesta observada en nuestro trabajo. Sin embargo nuestros resultados concuerdan como lo reportado por los autores al determinar que el AG inhibía la movilidad y con ello produjo disminución de la capacidad de formar biopelícula en EHEC y ETEC, después de someterlas a 10 °C.

Se ha reportado que, tanto la movilidad como la formación de biopelícula son de los primeros pasos en la patogénesis de los microorganismos, ya que estos no se encuentran como organismos solitarios, y de forma natural generalmente se asocian a superficies sólidas y se organizan en comunidades microbianas conocidas como biopelículas (Landini 2009). Esta capacidad es casi ubicua entre las bacterias por lo que, el que los patógenos se asocien en biopelícula puede llegar a tener implicaciones relacionadas a la salud o procesos industriales como el procesamiento de alimentos (Van Houdt y Michiels 2010).

O'May et al. (2012), estudiaron el efecto del AG, AT y GE a concentraciones de 500 mg/ml sobre la formación de biopelículas de bacterias Gram negativas, y observaron que, de los tres compuestos antimicrobianos probados, sólo con AG se disminuía la formación de biopelícula, en tanto que los otros compuestos provocaban el aumento de la biopelícula. Esto fue contrario con lo obtenido en nuestro trabajo, ya que las cepas de EHEC, ETEC y EPEC después de ser tratadas con AG disminuyeron la capacidad de formación de biopelícula (pasando de fuerte a débil).

Por otro lado, Huber et al. (2003) probaron que GE y AT tuvieron la capacidad de inhibir la formación de biopelícula de *E. coli* a 0.04 mg/ml, en nuestro trabajo ambos compuestos mostraron solo reducción de la capacidad de formación de biopelícula (GE débil, y AT moderada en EHEC). En ese mismo estudio los autores evaluaron la movilidad “swarming”, con ambos compuestos, observando que la movilidad no fue afectada por AT, pero si se reducía más del 80% por GE. Resultados similares fueron obtenidos en este trabajo con las cepas analizadas, al igual que con AT.

Como se mencionó anteriormente, la movilidad de las bacterias juega un papel fundamental en la colonización y su posterior propagación, donde éstas utilizan flagelos para “nadar” hacia una superficie donde posteriormente se unirán mediante sus adhesinas bacterianas, tales como pili tipo IV, lipopolisacárido y flagelo (O'May et al. 2012). La movilidad es crítica para la transición de las bacterias de su forma planctónica a la asociación a superficies, es por eso por lo que inhibir la movilidad puede estar relacionada con la disminución de la capacidad de formación de biopelícula y puede representar una importante estrategia para el control de estos microorganismos (Borges et al. 2013a).

La movilidad de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, también fue estudiada por Lee et al. (2009), después del tratamiento con GE, demostraron que a 0.025 mg/ml, y aunque el crecimiento no se veía alterado, la movilidad disminuía en 50%, y se inhibía completamente a 0.10 mg/ml. En nuestros resultados, la cepa EHEC O157:H7 analizada redujo la movilidad en 65.5%, pero después de exponerse a estrés frío la reducción fue significativamente menor (18%), aunque se desconoce la razón por la cual la reducción de movilidad sea menor.

En otro estudio, Hossain et al. (2017) evaluaron el efecto de MG en la movilidad “swarming” de *Pseudomonas aeruginosa*, encontrando inhibición dosis-dependiente y que a 0.25 mg/ml de MG se reducía cerca del 90% de la movilidad. En nuestro trabajo encontramos resultados diferentes ya que fue necesario utilizar concentraciones mayores (0.8 mg/ml en comparación con 0.25 mg/ml), para lograr inhibir (en EHEC) o reducir (ETEC, 73%) la movilidad bacteriana.

La viabilidad celular puede ser medida mediante citometría de flujo midiendo la integridad de la membrana, como un método indirecto. Se ha reportado que las células muertas presentan daño en la membrana al no poder retener un gradiente electroquímico y, por lo tanto, la pérdida de integridad de la membrana es considerada muerte celular (Comas-Riu y Rius 2009). La integridad de la membrana puede ser detectada por la exclusión o retención de algunos colorantes. Es para ello que los colorantes, como el yoduro de propidio (IP) o bromuro de etidio, tiñen los ácidos nucleicos de las células al poder penetrar a su interior debido a que la membrana ha sido dañada previamente (Rhena et al. 2003). La combinación de un colorante permeable a las células (familia de SYTO) y uno impermeable (IP), es utilizada para distinguir entre células vivas y muertas, por lo tanto, las células serán teñidas de acuerdo a su estado fisiológico (Comas-Riu y Rius 2009). SYTO 9 es un colorante que penetra en toda la bacteria, tiñendo a las células de color verde, IP solo penetra las células que han sufrido un daño en la membrana, y una combinación produce células fluorescentes rojas.

Al realizar los ensayos de viabilidad utilizando citometría de flujo, encontramos que el AT provocó el mayor porcentaje de mortalidad en las células que ya habían sido sometidas a 10°C, (94.8, 89 y 50.2% en EPEC, ETEC y EHEC respectivamente), seguido de GE



(mortalidad de 78, 58.4 y 42.7% para EPEC, ETEC y EHEC respectivamente). De interés especial fue la cepa de EHEC ya que prácticamente no fue afectada por el AG y MG (6.2 y 9.8% de mortalidad respectivamente).

Se sabe que el fenol cambia el funcionamiento de la membrana celular e influye en las proporciones proteína-lípidos de la membrana, induciendo la salida de iones potasio (Negi 2012). Algunas catequinas presentes en el té verde, como el GE, han sido capaces de perturbar la bicapa lipídica penetrando e interrumpiendo la barrera o causando fusión de membranas, proceso que provoca filtración de material y/o agregación (Cushnie y Lamb 2005). Esto concuerda con nuestros resultados ya que el GE y AT causaron la mayor mortalidad de las cepas de *E. coli* analizadas. El AG no mostró daño a la membrana significativo. Se ha reportado este efecto previamente, e incluso es potenciado cuando se une a quitosano, ya que el AG puede unirse a los componentes de la membrana y causar permeabilización (Lee y Je 2013).

La exposición a bajas temperaturas provoca reducción en la dinámica estructural de lípidos debido a una disminución en la fluidez de la membrana, volviéndose ésta rígida. Para adaptarse a la temperatura, los microorganismos como *E. coli*, aumentan la fluidez de la membrana por diversos mecanismos relacionados a ácidos grasos (Shivaji et al. 2010). Es por eso, que al exponerse la bacteria a 10°C, se observó daño a la integridad de la membrana, potenciando este efecto por la exposición posterior a CP.

Se ha reportado que la respuesta al choque frío ocurre a partir de la disminución de 15°C de su temperatura óptima y alcanza su máxima inducción después de 3 a 4 h, y posteriormente la síntesis de proteínas y el crecimiento normal se restablecen (Mihoub et al. 2003).

Específicamente en *E. coli*, Jones et al. (1992), encontraron que, al someterla a 10°C durante su fase logarítmica, se sintetizaban proteínas de choque frío (DnaK, RecA, piruvato deshidrogenasa, factores de elongación, entre algunas otras), razón por la cual utilizamos esta temperatura, a fin de inducir la síntesis de proteínas de choque frío (Csp). Dentro de éstas, la CspA, es la primera proteína descrita en *E. coli* durante la fase de aclimatación. Se ha demostrado que bajos niveles de la proteína CspA (50 µM) están

presentes durante el crecimiento exponencial en condiciones sin estrés, disminuyendo el nivel hasta casi indetectable en la última fase del crecimiento exponencial, y la expresión puede aumentar hasta 30 veces después de un choque frío (Ermolenko y Makhatadze 2002).

Algunos factores estresantes como cambio de temperatura, adición de nutrientes o exposición a antibióticos pueden bloquear completamente la síntesis normal de proteínas, llevando a la expresión de proteínas Csp. Aunque el mecanismo general no se encuentra completamente elucidado, se sabe que una traducción más eficiente del ARNm de *csp* puede contribuir a un aumento de su vida media bajo condiciones de frío (Mihoub et al. 2003).

En nuestro estudio, determinamos la expresión de los genes *cpsA* y *cpsB* después de exponerse a 10°C por 4 h y posteriormente a los CP durante 24 h. Encontramos que la mayoría de los CP disminuyeron la expresión de los genes *cspA* y *cspB* en los tres patotipos de *E. coli*. Estos resultados concuerdan con lo que Etchegaray y Inouye (1999) encontraron al exponer a *E. coli* a compuestos naturales, donde la expresión de *cspB* disminuye hasta 2 veces. Este mismo efecto fue observado en nuestro trabajo para los genes *csgA*, *csgD*, *fliA*, *flhC* y *flhD*, en todas las cepas estudiadas.

Se ha reportado que al disminuir la temperatura se bloquea el inicio de la traducción al estabilizarse la estructura secundaria del ARNm y los ribosomas pueden ser inhibidos por factores celulares que responden al cambio de temperatura, relación que puede explicar la inducción de las Csp ya que se ha demostrado que ribosomas de células previamente incubadas a bajas temperaturas sintetizan con menor eficiencia polipéptidos comparado a ribosomas de células incubadas a 37°C.

CspB, es la principal proteína identificada en *Bacillus subtilis*, y que ha sido reportada también en *E. coli*. CspA y CspB muestran >45% de homología. Graumann et al. (1997), demostraron que una mutación en el gen *cspB* causaba en *B. subtilis* un crecimiento lento a 15°C, sugiriendo que la función de CspB es primordial para el crecimiento a temperaturas bajas. Aunado a la presencia de antimicrobianos convencionales del grupo aminoglucósidos, Duval et al. (2010), observaron que la resistencia a éstos se podía

incrementar debido a una mutación en el gen *cspB* reafirmando con esto la función primordial de las proteínas de choque frío, y la importancia de comprobar la expresión de los genes que codifican para ellas después del choque frío (10°C) y la exposición a antimicrobianos naturales.

Sin embargo, existen muy pocos estudios que eluciden completamente el efecto que puedan tener los antimicrobianos naturales sobre la expresión de genes de proteínas de choque frío de bacterias Gram negativas como *E. coli* patógenas. Así como el efecto que dicha combinación pudiera tener en la expresión de genes relacionados a biopelícula y swarming.

En cepas de *E. coli* y bacterias relacionadas, la biosíntesis de curli es dependiente del  $\sigma^s$ , la subunidad sigma de la ARN polimerasa, el cual impulsa a su vez la expresión del regulador de biopelícula CsgD. Serra et al. (2016), demostró que GE, además de ser un eficaz inhibidor de biopelícula, puede inhibir la producción de fibras curli, ya sea interfiriendo en el ensamblaje de las subunidades curli y/o activando la respuesta  $\sigma^E$ , debido a que se interfiere con la expresión de *csgD*. En nuestros resultados, la expresión de los genes *csgA* y *csgD* después del tratamiento con GE se reprimió, suponiendo que el compuesto actuó como alguno de los mecanismos anteriormente citados, lo que ocasionó la disminución de la formación de biopelícula.

Algunos genes de motilidad como *fliA*, son necesarios para la producción de flagelos, que son esenciales para la movilidad “swarming”; mutaciones en el regulador de la motilidad, (*flhDC*), pueden eliminar la producción de flagelos y por lo tanto la movilidad (Tremblay y Déziel 2010).

La disminución de temperatura afecta todas las reacciones bioquímicas en la célula e influye en muchos otros procesos, por ejemplo, disminución de la fluidez de membrana, inhibición de la traducción ribosomal, aumento en la densidad helicoidal del ADN que influye en la apertura de la doble hélice, reducción de las actividades enzimáticas en diferente grado, plegamiento de proteínas, la formación de puentes disulfuro. Sin embargo, uno de los efectos del estrés frío mejor estudiados es la inhibición de la traducción (Horn et al. 2007).

## 9. CONCLUSIONES

- El AT, AG, MG y GE inhiben el crecimiento de EHEC O157:H7, ETEC O78:H11 y EPEC O111:NM, después de ser sometidas a 10°C.
- Las concentraciones sub-inhedorias de los cuatro CP utilizadas para inhibir el crecimiento de *E. coli* estuvieron entre 0.80 a 3.20 mg/ml.
- Las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) de los CP contra las cepas de *E. coli* se encontraron entre 1.0 y 3.40 mg/ml.
- El estrés frío en combinación con CP, provocan mortalidad bacteriana del 50, 90 y 90% de EHEC, ETEC y EPEC, respectivamente, siendo AT y GE, los más activos.
- El estrés frío en combinación con CP disminuyó la movilidad tipo swarming. AG la inhibió 100% en EHEC y ETEC mientras que MG lo hizo en EHEC.
- Todos los compuestos polifenólicos, después de someter a las cepas analizadas a 10°C lograron reducir el índice de formación de biopelícula. MG fue el compuesto con mayor reducción de IFB en ETEC y EPEC, y GE en EHEC.
- El estrés frío en combinación con CP modificó la expresión de genes de proteínas choque frío, así como los genes de virulencia relacionados a biopelícula y movilidad “swarming”.

## 10. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto del estrés frío y la combinación de dos o más CP en la viabilidad y factores de virulencia de los patotipos de *Escherichia coli*.
- Estudiar el efecto de la temperatura y CP sobre la composición de ácidos grasos de membrana *Escherichia coli*.
- Evaluar el efecto del estrés frío y CP sobre bacterias de importancia en alimentos en modelos alimenticios.

## 11. REFERENCIAS

- Andrews, JM. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* 48:5-16.
- Balouiri, M., Sadiki M y Ibensouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6:71-79.
- Barba, FJ., Koubaa M., Prado-Silva L., Orlie V y Sant'Ana AS. 2017 Mild processing applied to the inactivation of the main foodborne bacterial pathogens: A review. *Trends in Food Science & Technology* 66:20-35.
- Barria, C., Malecki M y Arraiano C. 2013. Bacterial adaptation to cold. *Microbiology*, 159:2437-2443.
- Beales, N. 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3:1-20.
- Borges, A., Abreu A, Malheiro J, Saavedra MJ y Simões M. 2013a. Biofilm prevention and control by dietary phytochemicals. In: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, A. Méndez-Vilas (Ed.). Spain, pp. 32-41.
- Borges, A., Ferreira C, Saavedra MJ y Simões M. 2013b. Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance* 19:256-265.
- Borges, A., Saavedra MJ y Simões M. 2012. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling* 28:755-767.
- Boulekbache-Makhlouf, L., Slimani S y Madani K. 2013. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Industrial Crops and Products* 41:85-89.
- Bollman, J., Ismond A. y Blank G. 2001. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in frozen foods: impact of the cold shock response. *International Journal of Food Microbiology* 64:127-138.

- Braga PC, Dal Sasso M y Sala MT. 2000. Sub-MIC concentrations of cefodizime interfere with various factors affecting bacterial virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45:15–25
- Campellone, KG y Leong JM. 2003. Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Current Opinion in Microbiology* 6:82-90.
- Cliver, DO., Potter M. y Riemann, HP. 2011. *Foodborne Infections and Intoxications*. Burlington, MA: Academic Press.
- Comas-Riu, J. y Rius N. 2009. Flow cytometry applications in the food industry. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36:999-1011.
- Cortés-Sánchez, A J., Garcia-Barrientos R., Minor-Pérez H., Dublán-García O y San Martin-Azocar AL. 2017. Food Safety and Antimicrobial Resistance an Approach to the Genus *Salmonella* spp. *Journal of Biosciences and Medicines* 5:55.
- Croxen, MA., Law RJ., Scholz R., Keeney KM., Wlodarska M y Finlay BB. 2013 Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 26:822-880.
- Cueva, C., Moreno-Arribas MV., Martín-Álvarez PJ., Bills G., Vicente MF., Basilio A., Rivas CL., Requena T., Rodríguez JM. y Bartolomé B. 2010 Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology* 161:372-382.
- Cushnie, TPT., y Lamb AJ. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26:343-356.
- Czapski, TR y Trun N. 2014 Expression of *csp* genes in *E. coli* K-12 in defined rich and defined minimal media during normal growth, and after cold-shock. *Gene* 547:91-97.
- Choi, JG., Mun SH., Chahar HS., Bharaj P., Kang OH , Kim SG, Shin DW y Kwon DY. 2014. Methyl Gallate from *Galla rhois* Successfully Controls Clinical Isolates of *Salmonella* Infection in Both In Vitro and In Vivo Systems. *PLOS ONE* 9(7):e102697.

- Chung, KT., Lu Z y Chou MW. 1998. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food and Chemical Toxicology* 36:1053-1060.
- Chu-Ky, S., Tourdot-Marechal R., Marechal PA y Guzzo, J. 2005. Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: Effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1717, 118-124.
- Daglia, M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23:174-181.
- Díaz-Gómez, R., Toledo-Araya H., López-Solís R y Obrique-Slier E. 2014. Combined effect of gallic acid and catechin against *Escherichia coli*. *LWT-Food Science and Technology* 59:896-900.
- Duval, BD., Mathew A., Satola SW y Shafer WM. 2010. Altered Growth, Pigmentation, and Antimicrobial Susceptibility Properties of *Staphylococcus aureus* Due to Loss of the Major Cold Shock Gene *cspB*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54:2283-2290.
- Elaine, S., Patricia MG., Frederick JA., Robert VT y Robert MH. 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States Unspecified Agents. *Emerging Infectious Disease journal* 17:16-22.
- Ermolenko, D. y Makhatadze G. 2002. Bacterial cold-shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 59:1902-1913.
- Escobar Rodríguez, AD. 2010. Extractos de plantas como inhibidores de la formación de biopelícula de *Escherichia coli* O157: H7. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Etchegaray, JP y Inouye M. 1999. A Sequence Downstream of the Initiation Codon Is Essential for Cold Shock Induction of *cspB* of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 181:5852-5854.
- Eshwar, AK., Guldemann C., Oevermann A y Tasara T. 2017. Cold-Shock Domain Family Proteins (Csps) Are Involved in Regulation of Virulence, Cellular Aggregation, and Flagella-Based Motility in *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7:453



- Flemming, HC y Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8:623-633.
- García-Heredia, A., García S., Merino-Mascorro JA., Feng P y Heredia N. 2016. Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence genes in enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Microbiology* 59:124-132.
- García-Heredia, A., Orue N., Heredia N y García S. 2013. Efficacy of citrus-based disinfectants to inhibit growth, swarming, and biofilm formation of *Salmonella* and decontaminate parsley. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 11:1295-1299.
- Giuliodori, AM., Gualerzi SO., Soto S., Vila J y Tavío MM. 2007. Review on bacterial stress topics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1113: 5-104.
- Goldstein, J., Pollitt NS y Inouye M. 1990. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:283-287.
- Gomes, TAT., Elias WP., Scaletsky ICA., Guth BEC., Rodrigues JF., Piazza RM., Ferreira LC y Martinez MB. 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology* 47:3-30.
- Graumann, P., Wendrich TM., Weber MH., Schröder K y Marahiel MA. 1997. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Molecular Microbiology* 25:741-756.
- Gyawali, R. y Ibrahim SA. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control* 46:412-429.
- Havelaar, AH., Kirk MD., Torgerson PR., Gibb HJ., Hald T., Lake RJ., Praet N., Bellinger DC., De Silva NR., Gargouri N., Speybroeck N., Cawthorne A., Mathers C., Stein C., Angulo FJ., Devleesschauwer B y G. 2015. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLOS Medicine* 12: e1001923.
- He, M., Wu T., Pan S y Xu X. 2014. Antimicrobial mechanism of flavonoids against *Escherichia coli* ATCC 25922 by model membrane study. *Applied Surface Science* 305:515-521.

- Horn, G., Hofweber R., Kremer W y Kalbitzer HR. 2007. Structure and function of bacterial cold shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64:1457-1470.
- Huber, B., Eberl L., Feucht W y Polster J. 2003. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Zeitschrift für Naturforschung C* 58:879-884.
- Hengge R. 2011. The General Stress Response in Gram-Negative Bacteria, In Storz G, Hengge R (ed), *Bacterial Stress Responses*, Second Edition. ASM Press, Washington, DC. pp 251-289.
- Hossain, MA., Lee, SJ., Park, NH Mechesso, AF B. T. Birhanu, J. Kang, M. A. Reza, J.W. Suh y Park SC. 2017. Impact of phenolic compounds in the acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing regulatory pathways. *Scientific Reports*, 7, 10618.
- Jones, PG., Cashel M., Glaser G y Neidhardt FC. 1992. Function of a relaxed-like state following temperature downshifts in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 174:3903-3914.
- Kang, MS., Oh JS., Kang IC., Hong SJ y Choi CH. 2008. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. *The Journal of Microbiology* 46:744-750.
- Kaper, JB., Nataro JP y Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2:123-140.
- Kearns, DB. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology* 8:634-644
- Kirk, MD., Pires SM., Black RE., Caipo M., Crump JA., Devleesschauwer B., Döpfer D., Fazil A., Fischer-Walker CL., Hald T., Hall AJ., Keddy KH., Lake RJ., Lanata CF., Torgerson PR., Havelaar AH y Angulo FJ. 2015. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLOS Medicine* 12:e1001921.
- Landini, P. 2009. Cross-talk mechanisms in biofilm formation and responses to environmental and physiological stress in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology* 160:259-266.

- Law, JWF., Ab Mutalib NS Chan KG y Lee LH. 2014. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology* 5:770
- Lee, DS. y Je JY. 2013. Gallic Acid-Grafted-Chitosan Inhibits Foodborne Pathogens by a Membrane Damage Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:6574-6579.
- Lee, KM., Kim WS., Lim J., Nam J., Youn M., Nam SW., Kim Y., Kim SH., Park W y Park S. 2009. Antipathogenic properties of green tea polyphenol epigallocatechin gallate at concentrations below the MIC against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of food protection* 72:325-331.
- López, D., Vlamakis H y Kolter R. 2010. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2:1-11
- Lucera, A., Costa C., Conte A y Del Nobile MA. 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology* 3:287
- Mandal, SM., Dias RO y Franco OL. 2017. Phenolic Compounds in Antimicrobial Therapy. *Journal of medicinal food* 20:1031-1038.
- Martínez Suárez, V., Dalmau Serra J y Martínez-Suárez J. 2012. Las cepas enterohemorrágicas de «*Escherichia coli*» como paradigma de patógenos emergentes. Lecciones de la gran epidemia de infección alimentaria centrada en Alemania en mayo y junio de 2011. *Acta Pediátrica Española* 70:57-60
- Mendonca, A., Jackson-Davis A., Moutiq R y Thomas-Popo E. 2018. Use of Natural Antimicrobials of Plant Origin to Improve the Microbiological Safety of Foods. In *Food and Feed Safety Systems and Analysis*, eds. S. C. Ricke, G. G. Atungulu, C. E. Rainwater & S. H. Park. Academic Press. 249-272
- Mihoub, F., Mistou MY., Guillot A., Leveau JY., Boubetra A y Billaux F. 2003. Cold adaptation of *Escherichia coli*: microbiological and proteomic approaches. *International journal of food microbiology* 89:171-184.
- Min ER., Pinchak WE., Anderson RC y Callaway TR. 2007. Effect of Tannins on the In Vitro Growth of *Escherichia coli* O157:H7 and In Vivo Growth of Generic *Escherichia coli* Excreted from Steers. *Journal of Food Protection* 70:543-550.

- Muniesa, M., Jofre J, García-Aljaro C y Blanch AR. 2006. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and Other Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the Environment. *Environmental Science & Technology* 40:7141-7149.
- Muniesa, M., Jofre J., García-Aljaro C y Blanch AR. 2006. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and Other Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the Environment. *Environmental Science & Technology* 40:7141-7149.
- Manning SD. 1971. *Escherichia coli* infections. Chelsea House publishers: New York, pp. 39-41.
- Malanovic N y Lohner K. 2016. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1858:936-946.
- Naves, P. L. F. y García FS. 2010. Formación de biopelículas por "*Escherichia coli*" y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas. Universidad Complutense de Madrid.
- Negi, P. S. 2012 Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156:7-17.
- Nitiema, L., Savadogo A, Simporé J, Dianou D y Traore A. 2012. In vitro Antimicrobial Activity of Some Phenolic Compounds (Coumarin and Quercetin) Against Gastroenteritis Bacterial Strains 3:183-187
- O'May, C., Ciobanu A, Lam H y Tufenkji N. 2012. Tannin derived materials can block swarming motility and enhance biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling* 28:1063-1076.
- Orue, N., García S, Feng P y Heredia N. 2013. Decontamination of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* O157: H7 from leafy green vegetables using edible plant extracts. *Journal of food science* 78:M290-M296.
- Obrig, TG. 2010. *Escherichia coli* Shiga Toxin Mechanisms of Action in Renal Disease. *Toxins* 2:2769.
- Patzi-Vargas, S., Zaidi MB, Perez-Martinez I, León-Cen M, Michel-Ayala A, Chaussabel D y Estrada-Garcia T. 2015. Diarrheagenic *Escherichia coli* Carrying

- Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9:e0003510.
- Pearson, JS., Giogha C, Lung TWF y Hartland EL. 2016. The Genetics of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence. *Annual Review of Genetics* 50:493-513.
- Phadtare, S. 2012. *Escherichia coli* cold-shock gene profiles in response to over-expression/deletion of CsdA, RNase R and PNPase and relevance to low-temperature RNA metabolism. *Genes to Cells* 17:850-874.
- Pisoschi, AM., Pop A, Georgescu C, Turcuş V, Olah NK y Mathe E. 2018. An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry* 143:922-935.
- Poole, K. 2012. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67:2069-2089.
- Pearson JS., Giogha C., Wong T y Hartland E. 2016. The genetics of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence. *The annual review of genetics* 50:493-513.
- Rhena, S., S. Ulrich, K. Ulf y R. Thorsten. 2003. Viability of bacteria from different aquatic habitats. II. Cellular fluorescent markers for membrane integrity and metabolic activity. *Aquatic Microbial Ecology* 32:137-150.
- Robins-Browne, RM., Holt KE, Ingle DJ, Hocking DM, Yang J y Tauschek M. 2016. Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6:141
- Rodriguez Saucedo EN. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible* 7:153-170.
- Sánchez, E., Heredia N., Camacho-Corona M. d. y García, S. 2013. Isolation, characterization and mode of antimicrobial action against *Vibrio cholerae* of methyl gallate isolated from *Acacia farnesiana*. *Journal of Applied Microbiology*. 115:1307-1316.

- Sanchez-Villamil, J. y Navarro-Garcia F. 2015. Role of virulence factors on host inflammatory response induced by diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. *Future Microbiology* 10:1009-1033.
- Sarjit, A., Wang Y y Dykes GA. 2015. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. *Food Microbiology* 46:227-233.
- Shao, D., Li J., Tang R., Liu L., Shi J., Huang Q y Yang H. 2015. Inhibition of gallic acid on the growth and biofilm formation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*. *Journal of food science* 80:M1299-M1305.
- Slobodníková, L., Fialová S., Rendeková K., Kováč J y Mučaji P. 2016 Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. *Molecules* 21:1717.
- Smith, AH., Zoetendal E y Mackie RI. 2005. Bacterial Mechanisms to Overcome Inhibitory Effects of Dietary Tannins. *Microbial Ecology* 50:197-205.
- Srey, S., Jahid IK y Ha SD. 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food control* 31:572-585.
- Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo Y., Amano F., Okubo T., Aoi N., Iwaki M y Kumagai S. 1999. Epigallocatechin gallate and gallic acid in green tea catechins inhibit extracellular release of Vero toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1472:42-50.
- Swiecicki, JM., Sliusarenko O y Weibel DB. 2013. From swimming to swarming: *Escherichia coli* cell motility in two-dimensions. *Integrative Biology* 5:1490-1494.
- Sperandio, V. y Pacheco A. 2012. Shiga toxin in enterohemorrhagic *E. coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2:81.
- Schembri MA., Kjargaard K y Klemm Per. 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Molecular microbiology* 48:253-267.
- Saldaña Z., Xicohtencatl-Cortes J., Avelino F., Phillips AD., Kaper JB., Puente JL y Girón JA. 2010. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environ microbiology* 11:992-1006.

- Steinmann J., Buer J., Pietschmann T., y Steinmann E. 2013. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *British Journal of Pharmacology* 168:1059-1073.
- Shivaji S., Jogadhenu S y Prakash S. 2010. How do bacteria sense and respond to low temperature? *Cellular and Molecular Immunology* 192:85-95.
- Serra, D. O., Mika, F., Richter, AM. y Hengge, R. 2016. The green tea polyphenol EGCG inhibits *E. coli* biofilm formation by impairing amyloid curli fibre assembly and downregulating the biofilm regulator CsgD via the  $\sigma^E$ -dependent sRNA RybB. *Molecular Microbiology*, 101:136-151.
- Tremblay, J y Déziel E. 2010. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics*, 11, 587.
- Van Houdt, R. y Michiels, C. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology* 109:1117-1131.
- Van Houdt, R. y Michiels, C. 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in microbiology*, 156, 626-633.
- Vaclavik, VA. y Christian EW. 2014. Food Preservation. In *Essentials of Food Science*, 323-342. New York, NY: Springer New York.
- White-Ziegler, CA., Um S, Perez NM, Berns AL, Malhowski AJ y Young S. 2008. Low temperature (23°C) increases expression of biofilm, cold shock and RpoS dependent genes in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* 154:148-166.
- Widsten, P., Cruz CD., Fletcher GC., Pajak MA y McGhie TK. 2014. Tannins and extracts of fruit byproducts: antibacterial activity against foodborne bacteria and antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry* 62:11146-11156.
- Wu, L., Ma L., Li X., Huang Z y Gao X. 2018. Contribution of the cold shock protein CspA to virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant Pathology*.
- Yang, SC., Lin CH., Aljuffali, IA y Fang, JY. 2017. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Archives of Microbiology* 199:811-825.
- Yu, K., Newman MC, Archbold DD y Hamilton-Kemp TR. 2001. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 on Strawberry Fruit and Reduction of the Pathogen Population by Chemical Agents. *Journal of Food Protection*, 64, 1334-1340.

Yeni, F., Yavaş S., Alpas H y Soyer Y. 2016. Most Common Foodborne Pathogens and Mycotoxins on Fresh Produce: A Review of Recent Outbreaks. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56:1532-1544.

Zhang, Y., Burkhardt DH., Rouskin S., Li GW., Weissman JS y Gross CA. 2018. A Stress Response that Monitors and Regulates mRNA Structure Is Central to Cold Shock Adaptation. *Molecular Cell* 70:274-286.e7.